

**Untersuchungen zum Antigenpeptid-Transporter TAP:
Mechanismus der Peptidbindung und Wirkprinzipien des
virealen TAP-Inhibitors ICP47**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Lars Neumann
aus Hildesheim

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich der Chemie Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 15.6.2000

Erstgutachter:	Prof. Dr. R. Tampé
Zweitgutachter:	Prof. Dr. N. Hampp
Tag der mündlichen Prüfung	4.7.2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung Molekulare Strukturbioogie in Martinsried und an der Philipps-Universität Marburg am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Tampé angefertigt.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

Neumann, L., Kraas, W., Uebel, S., Jung, G. & Tampé R. (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: A potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Mol. Biol.* 272, 484-492.

Beinert, D., Neumann, L., Uebel, S. & Tampé, R. (1997) Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. *Biochemistry* 36, 4694-4700.

Pfänder, R., Neumann, L., Zweckstetter, M., Seger, C., Holak, A.T. & Tampé R. (1999) Structure of the active domain of the herpes simplex virus protein ICP47 in water/sodium dodecyl sulfate solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 38, 13692-13698.

Neumann, L. & Tampé (1999) Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: Evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J. Mol. Biol.* 294, 1203-1213.

Neumann, L. & Tampé R. (2000) Dominant forces in peptide association to the transporter associated with antigen processing (TAP). In Vorbereitung.

Ergebnisse, die in der vorliegenden Dissertation nicht dargestellt wurden:

Neumann, L. *, Rädler, U. *, Schmitt, L. & Tampé, R. (2000) A novel construction block to design protein-protein interactions. In Vorbereitung.

* beide Autoren waren zu gleichen Teilen an der Arbeit beteiligt.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich den Personen danken, die am Entstehen dieser Doktorarbeit maßgeblich beteiligt waren.

Vor allen danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Tampé für seine intensive Betreuung, die inspirativen Diskussionen und die lehrreichen Jahre.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. W. Baumeister für die Möglichkeit den Teil dieser Arbeit, der im Max-Planck-Institut für Biochemie entstanden ist, in seiner Abteilung durchführen zu können.

Ganz besonders danke ich all den Kollegen, die die letzten 3,5 Jahre zu einer wunderbaren Zeit gemacht haben: Stephan Uebel, Stefanie Urlinger, Thomas Meyer, Kurt Pawlitschko, Stefan Ammer, Titia Plantinga, Anja Jestel, Ulf Rädler, Dirk Beinert, Stefan Pettinger, Ingmar Dorn, Sylvia Blunck, Eva Janas, Stas Gorbulev, Carmen Graf, Karl-Heinz Burk, Christian May, Nicole Löwer, Rupert Abele, Lutz Schmitt, Eckhart Linker, Carsten Horn, Ute Beck, Thomas Leiser, Stefan Kiontke, Martina Seitz, Dagmar Bauer, Christoph Kyritsis, Sascha Lankat-Buttgereit, Silke Hutschenreiter, Tatjana Becker, Charlotte Jung und natürlich Hilke Zander.

Eva Janas, Kurt Pawlitschko, Lutz Schmitt und Stephanie Zulley waren auf der Suche nach der griffigen Formulierung, nach dem exakten Fachwort und nach dem hoffentlich letzten Rechtschreibfehler unentbehrlich.

Auch möchte ich all den Kooperationspartnern ganz herzlich danken, die in dieser Arbeit nicht erwähnt wurden:

Prof. Dr. R. Peters von der Universität Münster für die Einführung in die OSTR-Technik und die schönen Meßwochen in Münster,

Prof. Dr. B. Seliger von der Universitätsklinik Mainz für die FACS-Analysen,

Dr. M. Pawlak von der Firma Novartis für die Möglichkeit seinen Aufbau zur Wechselwirkungsanalyse von fluoreszierenden Liganden mit auf Tantalpentoxid-Wellenleitern immobilisierten Rezeptoren zu verwenden,

Dr. B. Heck von der Firma Evotec für die FCS-Messungen,

Dr. B. Jordan von der Firma Aventis für die Möglichkeit in ihrer Abteilung ein Hochdurchsatzverfahren für die Suche nach TAP-Inhibitoren entwickeln,

Prof. Dr. Y. Dupont vom Centre d'Etudes Nucleaires de Grenoble für die Bereitstellung seines Hochgeschwindigkeitsfiltrations-Gerät und die wunderbare Zeit in Grenoble.

Und ein ganz besonders herzlichen Dank an die Steffi für ihre wunderbare Unterstützung in der Endphase dieser Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

A. <u>Einleitung</u>	1
1. Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle	1
2. Membrantransport mit Hilfe von ABC-Transportern	4
3. Der Antigenpeptid-Transportkomplex TAP	9
4. Einfluß viraler Faktoren auf den TAP-Komplex	13
5. Motivation und Zielsetzung	18
5.1 Assemblierung des Peptid-TAP-Komplexes	18
5.2 Der virale TAP-Inhibitor ICP47	18
B. <u>Material und Methoden</u>	19
1. Material	19
1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	19
1.2 Verbrauchsmaterial	20
1.3 Puffer	21
1.4 Geräte	23
2. Zellkultur	24
2.1 Kultivierung von Insektenzellen	24
2.2 Amplifikation von Bakuloviren	24
2.3 TAP-Expression	25
3. Synthesen und Reinigungsverfahren	25
3.1 Reinigung von Peptiden	25
3.2 Synthese von Fluoreszein-markierten Peptiden	26
3.3 Iodierung von Peptiden	26
3.3.1 Chloramin-T-Methode nach McConahey	26
3.3.2 Chloramin-T-beschichtete Reaktionsgefäße	26
4. Biochemische Methoden	27
4.1 Vesikelpräparation	27
4.2 Mikrosomenpräparation	27
4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
4.3.1 Absorptionsspektroskopie	28
4.3.2 BCA-Methode	28

4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
4.5	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	29
4.5.1	Silberfärbung	30
4.5.2	Kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff	30
4.6	<i>Immunoblot</i>	30
4.6.1	<i>Tank-Blot</i>	31
4.6.2	<i>Semidry-Blot</i>	31
4.6.3	ECL-Färbung	31
4.7	Affinitätsbestimmung von TAP-Liganden	32
4.7.1	Sättigungsbindungsexperiment	32
4.7.2	Kompetitionsexperiment	33
4.8	Transportexperiment	34
5.	Biophysikalische Methoden	35
5.1	Assoziations- und Dissoziationskinetik des Peptid-TAP-Komplexes	35
5.2	Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie	36
C.	<u>Ergebnisse</u>	37
1.	Kinetische und thermodynamische Analyse der Peptid-TAP-Assoziation	37
1.1	Fluoreszein-markierte Peptide werden vom TAP-Komplex gebunden und transportiert	37
1.2	Fluoreszenzlöschung TAP-gebundener Peptide	40
1.3	Peptidbindung an den TAP-Komplex ist ein Zweischnittprozeß	42
1.4	Assoziation und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes sind durch eine hohe Aktivierungsenergie gekennzeichnet	46
1.5	Drastische Wärmekapazitätzunahme während der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes	48
1.6	Temperaturabhängigkeit der Enthalpie- und Entropieänderung bei der Peptid-TAP-Assoziation	51
1.7	Interpretation der Wärmekapazitätzunahme bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes	52
1.8	In der Peptidbindungstasche des TAP-Komplexes sind Protonendonorguppen lokalisiert	55
2.	Essentielle Regionen und Struktur des viralen TAP-Inhibitors ICP47	57
2.1	Überlappende ICP47-Fragmente wechselwirken nicht mit dem TAP-Komplex	57
2.2	Wildtyp-ICP47 und die hochkonservierte N-terminale Region ICP47(1-53) zeigen die gleiche Aktivität	59
2.3	ICP47(3-34) entspricht der aktiven Domäne von ICP47	63
2.4	Ein Muster geladener Aminosäuren ist essentiell für die Aktivität von ICP47	65

2.5	Chimären aus ICP47-1 und ICP47-2	67
2.6	Negativ geladene Membranen induzieren eine α -helikale Struktur von ICP47	69
2.7	ICP47 bindet an negativ geladene Membranen	72
2.8	NMR-Struktur der aktiven Domäne von ICP47	74
D.	<u>Diskussion</u>	76
1.	Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes	76
2.	Aktive Domäne, kritische Regionen und strukturelle Aspekte von ICP47	80
E.	<u>Zusammenfassung</u>	85
F.	<u>Ausblick</u>	86
1.	Fluorogene Substrate des TAP-Komplexes	86
2.	Der virale TAP-Inhibitor ICP47	87
G.	<u>Literaturverzeichnis</u>	89
H.	<u>Abkürzungen</u>	104

A. Einleitung

1. Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle

Jeden Tag wird der menschliche Organismus von unzähligen Krankheitserregern attackiert. Gleichzeitig entarten fortwährend gewöhnliche Körperzellen zu Tumorzellen. Um auf diese Herausforderung effizient und flexibel reagieren zu können, hat sich im Zuge der Evolution bei Wirbeltieren das adaptive Immunsystem entwickelt (Engelhard, 1994). Dieses komplizierte Abwehrsystem läßt sich in eine humorale (Vitetta *et al.*, 1989) und eine zelluläre Immunität (Kupfer & Singer, 1993) gliedern. Das humorale Immunsystem beruht auf löslichen Rezeptoren (Antikörper), die von sogenannten Plasmazellen produziert werden und für die spezifische Erkennung von zellfremden Strukturen (Antigene) verantwortlich sind. Die Bindung von Antikörpern an Antigene wie z.B. Oberflächenstrukturen von Bakterien oder Viren, markiert diese für den Abbau durch phagozytierende Zellen oder für die Eliminierung durch das Komplementsystem bei dem es sich um eine Kaskade aus interagierenden Proteinen handelt.

Die zelluläre Immunität basiert auf der Erkennung von Antigenen in Assoziation mit speziellen Oberflächenproteinen, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), durch sogenannte T-Lymphozyten (Watts *et al.*, 1984). Zur Antigenpräsentation steht zum einen der MHC-Klasse-I- und zum anderen der MHC-Klasse-II-Komplex zur Verfügung (Klein *et al.*, 1993). Während der antikörpervermittelte Teil des Immunsystems ausschließlich extrazelluläre Pathogene erkennt, sind MHC-Klasse-I-Moleküle entscheidend an der Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Erregern wie z.B. Viren beteiligt. So präsentieren MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen Fragmente (Peptide) von zytosolischen Proteinen. Die Erkennung eines MHC-Klasse-I-gebundenen Peptids als Teil eines körperfremden Proteins regt zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Lymphozyten) zur Sekretion des Proteins Perforin und einiger weiterer Faktoren an, die die Lyse bzw. Apoptose der präsentierenden Zelle einleiten (Townsend & von Bodmer, 1989). Um die Eliminierung gesunder Körperzellen zu verhindern, werden im Laufe ihres Entwicklungsprozesses nur selbsttolerante T-Lymphozyten bis zur vollständigen Reife entwickelt (von Boehmer, 1994). Auf diese Weise werden nur Zellen lysiert, die z.B. virale oder Tumor-spezifische Strukturen präsentieren.

MHC-Klasse-II-Moleküle sind im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Proteinen kaum an der Bekämpfung intrazellulärer Erreger beteiligt. Der MHC-Klasse-II-vermittelte Teil des Immunsystems bildet vielmehr das Bindeglied zwischen humoraler und zellulärer Immunität. MHC-Klasse-II-Komplexe präsentieren auf der Oberfläche spezialisierter

antigenpräsentierender Zellen (*antigen presenting cells*, APC) Fragmente von phagozytierten, extrazellulären Strukturen. Sogenannte T-Helfer-Zellen ($CD4^+$ -T-Lymphozyten) leiten die Reifung von Plasmazellen und die Produktion von spezifischen Antikörpern ein, sobald sie ein präsentiertes Peptid als fremd erkennen.

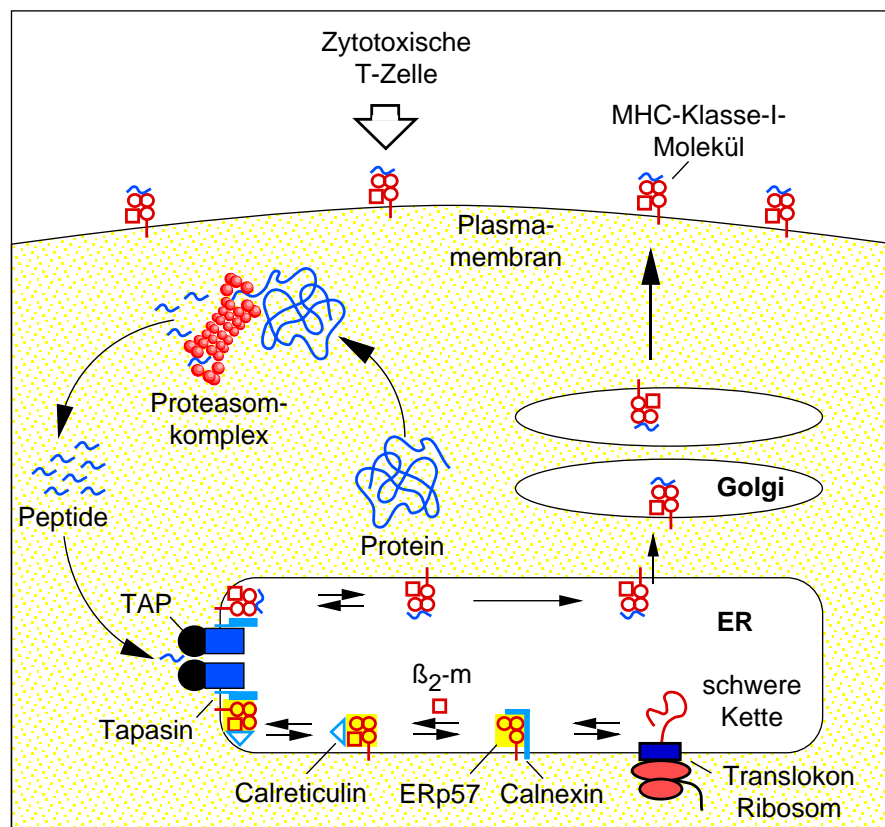


Abb. 1 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Endogene Proteine werden durch den Proteasomkomplex zu Peptiden degradiert, TAP-abhängig in das ER translokalisiert, mit Hilfe des Beladungskomplexes, der aus dem Antigenpeptid-Transporter TAP, Tapasin, Calreticulin, ERp57 und MHC-Klasse-I besteht, an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert. Stammt das Peptid aus einem körperfremden Protein, wird die präsentierende Zelle von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und durch die Ausschüttung von Perforinen und einigen weiteren Faktoren lysiert bzw. zur Apoptose angeregt. Die Assemblierung der MHC-Klasse-I-Moleküle wird durch die Chaperone Calnexin, Calreticulin sowie durch die thiolabhängige Reduktase ERp57 unterstützt (abgewandelt nach Abele & Tampé, 1999).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Antigenpeptid-Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*). Da der TAP-Komplex eine entscheidende Rolle in der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation spielt, wird im folgenden dieser Zweig des Immunsystems detailliert beschrieben (Abb. 1). Damit zytosolische Proteinbruchstücke präsentiert werden können, müssen Proteine abgebaut werden. Für diesen Prozeß wird der multikatalytische 20S/26S Proteasomkomplex verantwortlich gemacht (Seufert & Jentsch, 1992, Rock & Goldberg, 1999), der endogene Proteine zu kurzen

Peptiden (8-13 Aminosäuren) degradiert (Wenzel *et al.*, 1994; Ehring *et al.*, 1996; Kisselev *et al.*, 1998). Das katalytische Zentrum des 26S Proteasomkomplexes wird durch das 20S Proteasom gebildet, das aus 28 faßförmig angeordneten Untereinheiten besteht (Baumeister *et al.*, 1998). Röntgenstrukturanalysen der Proteasomkomplexe aus *Thermoplasma acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) und *Saccharomyces cerevisiae* (Groll *et al.*, 1997) zeigten, daß die 28 Untereinheiten vier übereinander gelagerte Ringe bilden. Der obere und untere Ring werden durch sogenannte α -Untereinheiten geformt, während die beiden inneren Ringe aus β -Untereinheiten bestehen. Die generierten Peptide werden durch den Antigenpeptid-Transporter TAP ATP-abhängig vom Zytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert (Neefjes *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1993; Androlewicz *et al.*, 1993) (Abb. 1). Dem Translokationsschritt ist ein ATP-unabhängiger Peptidbindungsschritt vorgelagert (van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995). Der TAP-Komplex liegt als Heterodimer der Untereinheiten TAP1 (81 kDa) und TAP2 (75 kDa) vor (Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1994) und gehört zur Proteinsuperfamilie der *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter.

Im ER werden die Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten. Die erste Untereinheit wird durch die schwere Kette (45 kDa) gebildet, die aus den drei Domänen $\alpha 1$ – $\alpha 3$ aufgebaut ist. Die zweite Untereinheit besteht aus der β_2 -Mikroglobulinkette (β_2 -m, 12 kDa). Der peptidbindende Spalt wird durch $\alpha 1$ und $\alpha 2$ geformt, während β_2 -m über die $\alpha 3$ -Einheit gebunden wird. Für die Membranverankerung ist die schwere Kette verantwortlich (Engelhard, 1994). Strukturelle Untersuchungen zeigten, daß der Peptidbindungsspalt an beiden Enden verschlossen ist, was das relativ enge Längenoptimum (8-10 AS) für gebundene Peptide erklärt (Schumacher *et al.*, 1991; Fremont *et al.*, 1992; Madden *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Blouvier & Wiley, 1994).

Für die Peptidbeladung des MHC-Klasse-I-Moleküls sind mehrere Hilfsproteine notwendig (Lehner & Trowsdale, 1998a; Elliot, 1997). Das Ca^{2+} -bindende, ER-ständige Transmembranprotein Calnexin bindet und stabilisiert die naszierende schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Vassilakos *et al.*, 1996). Die thiolabhängige Reduktase ERp57 bindet ebenfalls an den Komplex aus der schweren Kette und dem Chaperon Calnexin und unterstützt die Bildung der korrekten Disulfidbrücken (Hughes & Cresswell, 1998; Lindquist *et al.*, 1998; Morrice & Powis, 1998). Anschließend wird Calnexin durch das Chaperon Calreticulin ausgetauscht und β_2 -Mikroglobulin gebunden (Sadasivan *et al.*, 1996). Schließlich bildet sich der Beladungskomplex, der die effiziente Peptid-MHC-Klasse-I-Assemblierung ermöglicht. Diese makromolekulare Struktur besteht wahrscheinlich aus vier MHC-Klasse-I-Molekülen, die über vier Tapasinproteine mit einem Antigenpeptid-Transporter TAP verbrückt sind. Zusätzlich wurde Calreticulin und ERp57 im Beladungskomplex gefunden (Ortmann *et al.*, 1997; Hughes & Cresswell,

1998; Cresswell *et al.*, 1999). Der direkte physische Kontakt erleichtert die Übergabe des transportierten Peptids vom TAP-Komplex zum MHC-Klasse-I-Protein. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß Tapasin die Zahl funktionaler TAP-Komplexe erhöht und so für einen effizienten Peptidtransport vom ER in das Zytosol sorgt (Lehner & Trowsdale, 1998a; Lehner *et al.*, 1998b). Nachdem der ternäre Komplex auseinandergefallen ist, werden die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle über das Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert (Suh *et al.*, 1996; Knittler *et al.*, 1999).

2. Membrantransport mit Hilfe von ABC-Transportern

Transportvorgänge an Membranen zählen zu den elementarsten Vorgängen lebender Organismen. Nur sie erlauben es Zellen über ihre Plasmamembran mit der Umwelt in Kontakt zu treten. Die Kompartimentierung eukaryontischer Zellen erfordert zusätzlich Transportprozesse über die intrazellulären Organellmembranen. Lediglich kleine hydrophobe Moleküle können die Phospholipidmembranen ungehindert durchdringen. Ionen und polare Substanzen dagegen sind auf die Hilfe spezieller Transportproteine angewiesen. Solche Proteine ermöglichen die selektive Aufnahme von Nährstoffen, den Erhalt von Ionengradienten, die Ausschleusung von Toxinen und Signalstoffen, die intra- und interzelluläre Verteilung von Proteinen und vieles mehr.

Bei Transportvorgängen wird zwischen passivem und aktivem Transport unterschieden. Passiver Transport verläuft entlang eines Konzentrationsgradienten und erfordert lediglich die spezifische Erhöhung der Membranpermeabilität für den zu transportierenden Stoff. So bildet z.B. das Antibiotikum Gramicidin A eine Membranpore, die Protonen und Alkaliionen aber keine Ca^{2+} -Ionen passieren läßt (Weinstein *et al.*, 1979; Anderson, 1984). Das Carrier-Molekül Valinomycin dagegen bildet mit K^{+} -Ionen einen membrangängigen Komplex und ermöglicht so die K^{+} -Diffusion durch Membranen (Krasne *et al.*, 1971). Im Gegensatz zum passiven Transport wird beim aktiven Transport gegen ein Konzentrationsgefälle gepumpt. Die dafür notwendige Energie kann aus unterschiedlichen Quellen stammen. So wird die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium halobium* durch die Absorption von Lichtquanten getrieben (Stoeckenius, 1976). Der Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Reduktase) aus der oxidativen Phosphorylierungskaskade erzeugt einen Protonengradienten mit Hilfe der Energie, die bei der Oxidation von NADH (Nikotinamidadenindinukleotid) frei wird (Hatefi, 1985). Solche Konzentrationsgradienten werden wiederum verwendet, um andere Verbindungen aktiv zu transportieren. Die Lactosepermease von *Escherichia coli* (*E. coli*) kotransportiert z.B. ein Proton und ein Lactosemolekül in die Zelle. Der Protonenfluß entlang des Protonengradienten energetisiert hierbei den Lactosetransport (Wright *et al.*, 1986).

Neben diesem Symportmechanismus, bei dem verschiedene Molekülesorten in die gleiche Richtung transportiert werden, sind auch Antiporter bekannt. So wird der Ca^{2+} -Export mit Hilfe des Na^+ - Ca^{2+} -Antiporters durch den Einstrom von Na^+ -Ionen angetrieben (Carafoli, 1987). Häufig wird die Energie allerdings durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Das am gründlichsten untersuchte Beispiel hierfür stellt die Na^+ - K^+ -ATPase der Plasmamembran dar, die unter Hydrolyse von einem ATP-Molekül drei Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus- und zwei K^+ -Ionen hineinpumpt (Cantley *et al.*, 1983). Nach einem vergleichbaren Mechanismus werden die sogenannten ABC-Transporter energisiert, zu denen auch der im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchte Antigenpeptid-Transporter TAP gehört. Im folgenden wird diese Transporterfamilie detailliert dargestellt.

Bei der Proteinsuperfamilie der ABC-Transporter handelt es sich um eine weit verbreitete paraloge Proteingruppe. Innerhalb zahlreicher Lebensformen, vom Bakterium über Pilze bis zum Menschen, übernimmt diese Molekülfamilie den Transport eines weiten Substratspektrums über Zell- und Organellmembranen. So kodieren etwa 2 % der Gene von *E. coli* für ABC-Transporter, 28 ABC-Proteine wurden im Hefegenom gefunden und beim Menschen werden 70 bis 100 Mitglieder dieser Proteinfamilie vermutet (Higgins, 1992; Holland & Blight, 1999). Das Aufgabenfeld der ABC-Transporter ist weit gestreut. Die ABC-Proteine von *E. coli* GlnHPQ (Nohno *et al.*, 1986) oder MalFGK/E (Gilson *et al.*, 1982; Froshauer & Beckwith, 1984; Dassa & Hofnung, 1985) dienen der Aufnahme von Nährstoffen wie Glutamin oder Maltose. Andere ABC-Transporter vermitteln den Ex- und Import von Proteinen. Hämolysin B exportiert z.B. das 107 kDa Toxin α -Hämolysin über die Plasmamembran von *E. coli* (Felmlee *et al.*, 1985). Zahlreiche weitere Vertreter dieser Proteinfamilie sind von klinischem Interesse. So sind ABC-Transporter für viele Pharmakaresistenzen verantwortlich. Die Erythromycinresistenz von *Staphylococcus* lässt sich auf die Wirkung des ABC-Proteins MsrA zurückführen, das das Antibiotikum aus dem Bakterium transportiert (Ross *et al.*, 1990). Der ABC-Transporter MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) erzeugt durch seine Überexpression in Tumorzellen eine Resistenz gegen Chemopharmaka, indem es die intrazelluläre Konzentration der Medikamente durch Export herabsetzt (Endicott & Ling, 1989; Gottesmann & Pastan, 1993). Die Adrenoleukodystrophie, hervorgerufen durch eine unzureichende β -Oxidation langer Fettsäureketten in den Peroxisomen, korreliert mit Mutationen im Gen für das Adrenoleukodystrophieprotein ALDP (Kamijo *et al.*, 1990). Defekte im Chloridkanal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) führen zur Mukoviszidose, der häufigsten tödlichen Erbkrankheit in Europa und den USA, bei der es aufgrund eines gestörten Wasserhaushalts der Epithelzellschicht in den Lungen der Patienten zu einer erhöhten Mukussekretion kommt (Collins, 1992). Veränderungen in der Nukleotidbindungsdomäne des Sulfonylharnstoff Rezeptors SUR1 rufen das Krankheitsbild der

persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI) hervor, bei der es zu einer erhöhten Insulinsekretion kommt (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995). Der in der ER-Membran lokalisierte Antigenpeptid-Transporter TAP ist schließlich entscheidend an der Immunabwehr von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen wie z.B. Viren beteiligt (Abele & Tampé, 1999).

Allen ABC-Transportern ist der modulare Aufbau aus mindestens vier Domänen gleich. Zwei Domänen bilden den hydrophoben Transmembranbereich, zwei weitere sind auf der zytosolischen Membranseite lokalisiert und formen die Nukleotidbindungsdomänen (Abb. 2A). Während die Transmembrandomänen innerhalb der ABC-Transporterfamilie nur geringe Sequenzhomologie aufweisen, zeigen die Nukleotidbindungsdomänen eine Sequenzidentität von 30 %. In jeder Nukleotidbindungsdomäne liegen die für ABC-Transporter charakteristischen hochkonservierten Walker A und Walker B Motive. Zusätzlich sind ABC-Proteine durch die sogenannte EAA-Region in der letzten zytosolischen Schleife der Transmembrandomänen und den *C-Loop* gekennzeichnet, der 20-30 Aminosäuren N-terminal von der Walker B Region lokalisiert ist (Higgins, 1992). Das Walker A Motiv zeigt eine Konsensussequenz GXXXXGKS/T, während das Walker B Motiv aus vier hydrophoben Aminosäuren und einem Aspartat- oder Glutamatrest besteht (Walker *et al.*, 1982). Basierend auf Röntgenstrukturanalysen von ATPasen, die ebenfalls Walker A und B Motive enthalten wie Ras p21 (Eugner *et al.*, 1987), die F₁F₀-ATPase (Abrahams *et al.*, 1994) oder dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) (Bertchold *et al.*, 1993) sowie aufgrund der kürzlich gelösten Struktur der Nukleotidbindungsdomäne des ABC-Transporters Histidinpermease (HisP) (Hung *et al.*, 1998) wird angenommen, daß das Lysin in der Walker A Region eine Salzbrücke zu der γ -Phosphatgruppe des gebundenen ATP bildet. Die Walker B Region koordiniert das Mg²⁺-Ion des Mg²⁺-ATP-Komplexes (Senior *et al.*, 1992; Senior & Al-Shawi, 1993). Der *C-Loop* mit der Konsensussequenz GGQR/K/Q kommt ausschließlich in ABC-Transportern und G-Proteinen vor (Lambright *et al.*, 1994; Manavalan *et al.*, 1995). Mutationsstudien deuten daraufhin, daß diese Region mit der EAA-Region kommuniziert und auf diese Weise Informationen von der Nukleotidbindungs- an die Substratbindungsstelle weiterleiten (Dassa, 1990; Cotten *et al.*, 1996). So wird das Substratspektrum von humanem MDR1 durch den Austausch des *C-Loop*-Lysinrests in Abhängigkeit von der Natur der eingebauten Aminosäure modifiziert. Wird Lysin durch Arginin substituiert, werden andere Substrate bevorzugt als bei der K/E-Mutante (Hoof *et al.*, 1994). Die Entdeckung einer natürlich auftretenden nicht-aktiven TAP-Mutante aus einer Lungenkrebszelllinie, bei der das Arginin an Position 659 zwischen *C-Loop* und Walker B Sequenz von TAP1 durch Glutamin substituiert ist, unterstreicht zusätzlich die Bedeutung dieser Region (Chen *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den Nukleotidbindungsdomänen sind die Transmembrandomänen kaum konserviert. Trotz der geringen Sequenzhomologie wird eine ähnliche

Faltung angenommen. Für CFTR und MDR1 wurde experimentell nachgewiesen, daß jede Transmembrandomäne aus sechs Transmembranhelizes besteht (Wang *et al.*, 1991; Ames & Lecar, 1992; Gentschev & Goebel, 1992; Gottesman & Pastan, 1993; Loo & Clarke, 1993a; Loo & Clarke, 1993b). Basierend auf Hydrophobizitätsanalysen werden für den Maltosetransporter MalF acht Transmembranhelizes vorhergesagt (Froshauer *et al.*, 1988), während die Transmembrandomänen des Antigenpeptid-Transporters TAP die Membran jeweils acht- bis zehnmal durchqueren (Gileadi & Higgins, 1997; Tampé *et al.*, 1997; Vos *et al.*, 1999) (Abb. 3). Photoquervernetzungsstudien haben gezeigt, daß sowohl bei MDR1 (Greenberger, 1993; Morris *et al.*, 1994) als auch beim Antigenpeptid-Transporter TAP beide Transmembrandomänen (Nijenhuis *et al.*, 1996a; Nijenhuis & Hämmerling, 1996b) gemeinsam die Substratbindungsstelle bilden.

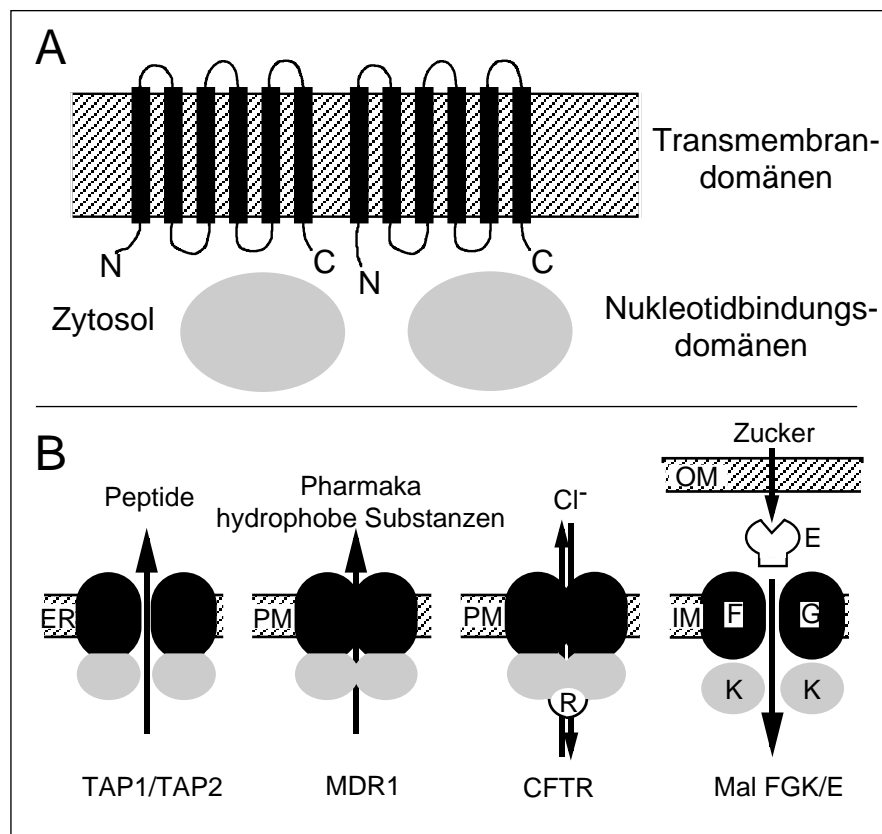


Abb.2 Struktur von ABC-Transportern

(A) ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembrandomänen (schwarz), die die Membran mit sechs bis zehn α -Helizes durchspannen und zwei hydrophilen, zytosolischen Domänen (grau) in denen die hochkonservierten ATP-Bindungsregionen liegen. Zusätzlich zu diesen vier Domänen können weitere vorhanden sein (weiß).

(B) Die ABC-Proteine transportieren verschiedene Substrate u.a. über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), die Plasmamembran (PM) sowie die äußere (OM) oder die innere Bakterienmembran (IM).

Die Verknüpfung der vier Domänen kann auf verschiedene Weise realisiert sein (Abb. 2B). Prokaryonten synthetisieren vorwiegend alle Untereinheiten als getrennte Polypeptidketten, die miteinander zum funktionalen Transportkomplex assemblieren (Doige & Ames, 1993). Höhere Eukaryonten dagegen exprimieren häufig die einzelnen Domänen auf ein oder zwei Polypeptidsträngen. Der Antigenpeptid-Transportkomplex TAP baut sich z.B. aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 auf, die jeweils aus einer Transmembrandomäne und einer Nukleotidbindungsdomäne bestehen (Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992), während beim Multidrogenresistenzprotein MDR1 alle Domänen auf einer einzigen Polypeptidkette liegen. Zusätzlich zu den vier Domänen können weitere vorhanden sein. So findet man beispielsweise beim CFTR-Protein eine fünfte regulatorische Domäne R (Cheng *et al.*, 1991) und bei dem Maltosetransporter MalFGK/E ein zusätzliches periplasmatisches Bindungsprotein E (Reidl *et al.*, 1989).

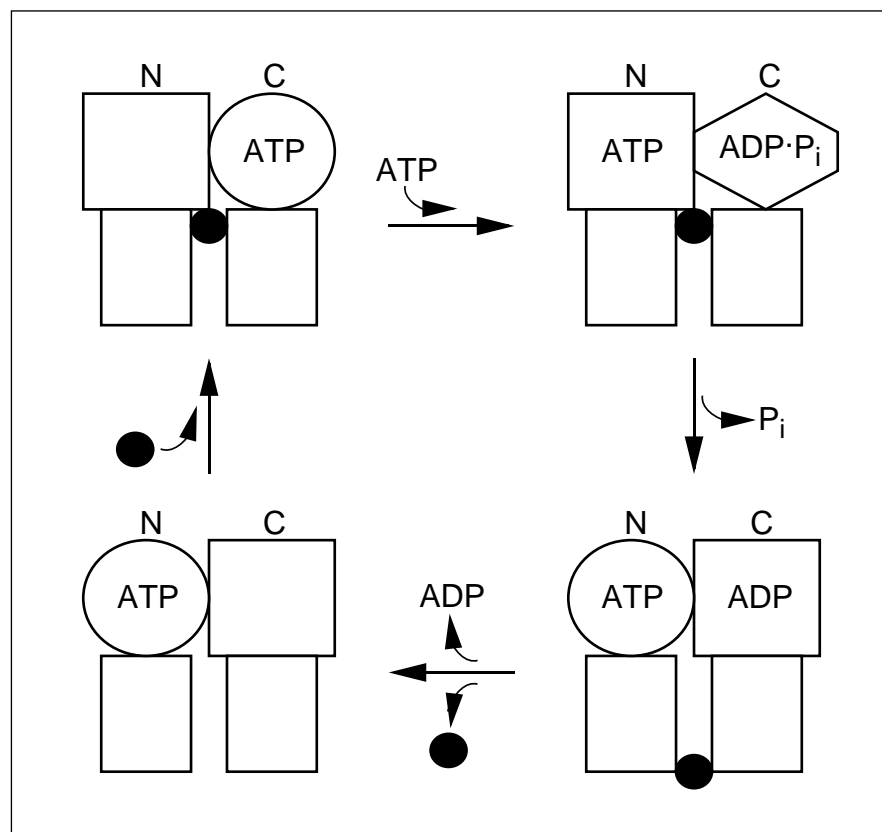


Abb. 3 Modell für den Transportzyklus von MDR1

Die Rechtecke repräsentieren die Transmembrandomänen, während die offenen Kreise, Quadrate und das Sechseck verschiedenen Konformationen der Nukleotidbindungsdomänen entsprechen. Der geschlossene Kreis stellt das Substrat dar. Die beiden Nukleotidbindungsdomänen wurden entsprechend ihrer relativen Lage zum N- bzw. C-Terminus mit N oder C bezeichnet (aus Senior & Gadsby, 1997).

Über den Transportmechanismus der ABC-Transporter ist wenig bekannt. Lediglich für den Transportzyklus von MDR1 und CFTR existieren vorläufige Arbeitsmodelle (Senior & Gadsby, 1997). Für MDR1, einem engen Verwandten des Antigenpeptid-Transporters TAP, wird folgender Mechanismus angenommen (Abb. 3). Zu Beginn des Zyklusses ist ATP z.B. an der C-terminalen Nukleotidbindungsdomäne (C-Nukleotidbindungsdomäne) gebunden. Zusätzlich bindet das zu transportierende Substrat an die Substratbindungsstelle. Die Bindung eines zweiten ATP-Moleküls an die N-terminale Nukleotidbindungsstelle (N-Nukleotidbindungsdomäne) induziert die ATP-Hydrolyse in der C-Nukleotidbindungsdomäne. Mit Hilfe der freiwerdenden Energie wird die C-Nukleotidbindungsdomäne in eine energiereiche Konformation überführt. Im Gegensatz zu den P-Typ-ATPasen wie z.B. der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase werden die ABC-Transporter hierbei nicht kovalent phosphoryliert. Gleichzeitig nimmt die N-Nukleotidbindungsdomäne eine Struktur an, die die ATP-Hydrolyse verhindert. Bei der Relaxation der C-Domäne wird das Substrat von der hochaffinen zytosolischen Substratbindungsstelle zur niederaffinen extrazellulären Bindungsstelle bewegt und das Phosphatanion verläßt die C-Nukleotidbindungsdomäne. Nachdem das Substrat und das ADP von MDR1 dissoziiert sind, kehrt der Transporter durch die Bindung eines neuen Substratmoleküls in seinen Ausgangszustand zurück und der Zyklus kann erneut durchlaufen werden. Im zweiten Transportzyklus haben die beiden Nukleotidbindungsdomänen allerdings ihre Rollen vertauscht und die ATP-Hydrolyse findet jetzt in der N-Nukleotidbindungsdomäne statt.

3. Der Antigenpeptid-Transportkomplex TAP

Aufgrund der Zugehörigkeit des TAP-Komplexes zur Proteinfamilie der ABC-Transporter und der Kodierung beider Untereinheiten TAP1 und TAP2 im MHC-Klasse-II-Genlocus wurde schon unmittelbar nach seiner Sequenzierung spekuliert, ob diese Proteine die für die Assemblierung der MHC-Klasse-I benötigten Peptide in das ER transportieren (Townsend & von Bodmer, 1989; Deverson *et al.*, 1990; Monaco *et al.*, 1990; Spies *et al.*, 1990; Trowsdale *et al.*, 1990). Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, daß sich auf der Oberfläche von TAP-Defektzelllinien instabile, also "leere" MHC-Klasse-I-Komplexe befinden (Townsend & von Bodmer, 1989; Ljunggren *et al.*, 1990; Townsend *et al.*, 1990), während Zellen, die mit den fehlenden TAP-Genen transfiziert wurden, Oberflächenexpression von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Komplexen zeigen (Powis *et al.*, 1991; Attaya *et al.*, 1992). Mit Hilfe der im ER-Lumen lokalisierten Glykosylierungsmaschinerie konnte schließlich direkt bewiesen werden, daß Peptide TAP- und ATP-abhängig in das ER transportiert werden. So wurden TAP-exprimierende und TAP-defiziente Zellen mit Streptolysin O, einem

bakteriellen Toxin, das in der Plasmamembran von Eukaryonten Poren bildet, permeabilisiert und in An- und Abwesenheit von ATP mit radioaktiv markierten Peptiden inkubiert, die eine N-Glykosylierungskonsensussequenz (NXS/T) trugen. Glykosylierte und folglich in das ER transportierte Peptide wurden nach der Lyse der Zellen mit Hilfe zuckerbindender Concanavalin A-Sepharose isoliert und über Radioaktivitätsmessung quantifiziert (Neefjes *et al.*, 1993; Androlewicz & Cresswell, 1994). Analoge Experimente mit TAP-haltigen und TAP-freien Mikrosomen führten zu gleichen Ergebnissen (Meyer *et al.*, 1994). Einen weiteren Beweis für die Funktion des TAP-Komplexes lieferte die ATP- und TAP-abhängige Beladung von ER-ständigen MHC-Klasse-I-Molekülen mit radioaktiv markierten Peptiden (Androlewicz *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde gezeigt, daß nur in Anwesenheit des TAP-Komplexes und ATP peptidbindende Proteine im ER mit photoreaktiven Peptiden markiert werden können (Lammert *et al.*, 1997; Marusina *et al.*, 1997; Spee & Neefjes, 1997). Diese indirekten Methoden zum Nachweis des Peptidtransports in das ER waren notwendig, da neben dem Transportsystem TAP ein zusätzliches, nicht näher charakterisiertes Peptidexportsystem existiert, das die Peptidakkumulation im ER verhindert (Roelse *et al.*, 1994).

Weitere Untersuchungen der ATP-Abhängigkeit des TAP-Komplexes zeigten, daß der Transporter auch durch GTP, CTP und UTP energetisiert werden kann, während ADP dazu nicht in der Lage ist (Meyer, 1996). Durch die Verwendung von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga wie AMP-PNP oder AMP-PCP wurde sichergestellt, daß nicht die ATP-Bindung, sondern die ATP-Hydrolyse für die Transportaktivität des TAP-Komplexes verantwortlich ist (Neefjes *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1994). Vor kurzem wurde in unserer Gruppe erstmals der Beweis erbracht, daß die ATP-Hydrolyse direkt mit der Peptidbindung zusammenhängt. Nur in Gegenwart von Peptiden, die vom TAP-Komplex als Substrat erkannt werden, konnte die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus ATP stimuliert werden (Gorbulev & Tampé, unveröffentlichte Daten). Neben der Hydrolyse von ATP ist auch die folgende Dissoziation des TAP-ADP-Phosphat-Komplexes entscheidend. So blockiert das zum Phosphation strukturanaloge Vanadat die Funktion von TAP, indem es durch seine hohe Affinität zur Phosphatbindungsstelle die Dissoziation dieses Komplex verhindert (Meyer, 1996).

Die Beteiligung weiterer Proteine an der TAP-abhängigen Peptidtranslokation ist unwahrscheinlich wie die funktionale, heterologe Expression von humanem Antigenpeptid-Transporter TAP in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen (Meyer *et al.*, 1994) und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Urlinger *et al.*, 1997) zeigt, denen die Faktoren eines hochentwickelten Säugerimmunsystems fehlen. Die Anwesenheit beider Untereinheiten TAP1 (748 AS, berechnet 81 kDa) und TAP2 (686, berechnet 75 kDa) ist dagegen für die Funktion des TAP-Komplexes essentiell (Kelly *et al.*, 1992;

Spies *et al.*, 1992; Neefjes *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1994). Zwischen TAP1 und TAP2 wurde eine Sequenzhomologie von 60 % für die Nukleotidbindungsdomänen gefunden, während die Transmembrandomänen nur eine Homologie von 30 % aufweisen. Hydrophobizitätsberechnungen ergaben sechs bis zehn Transmembranhelizes für TAP1 und TAP2 (Momburg *et al.*, 1996; Nijenhuis & Hämmerling, 1996b; Elliott, 1997; Tampé *et al.*, 1997) (Abb. 4). Zum eigentlichen Kern der Transmembrandomäne werden allerdings nur die jeweils sechs C-terminalen Transmembranhelizes gerechnet, da die übrigen Transmembranbereiche keine Homologie zu anderen ABC-Transportern aufweisen.

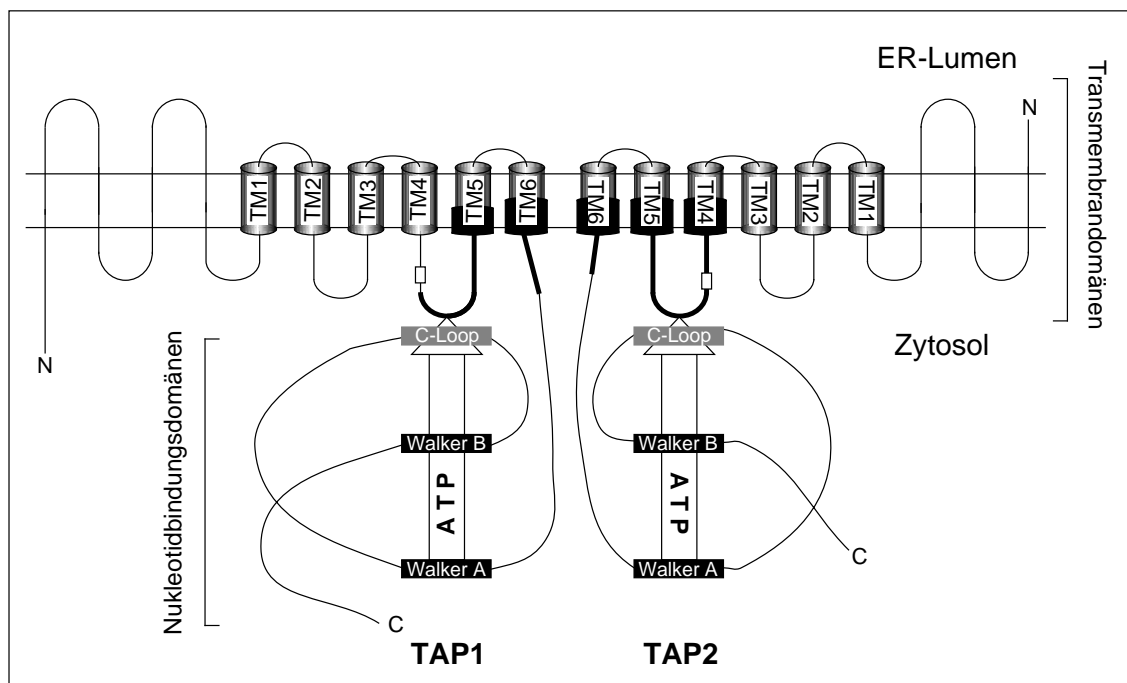


Abb. 4 Membrantopologie des TAP-Komplexes

Die Transmembranhelizes (TM), die auch in anderen ABC-Transportern gefunden werden, sind als Zylinder dargestellt. Transmembrandomänen, die ausschließlich für TAP1 bzw. TAP2 vorhergesagt werden, sind als einfache Linien durch die Membran angedeutet. Das offene Rechteck symbolisiert die EAA-Region. ATP wird durch die Walker A und B Motive gebunden. In Analogie zu anderen ABC-Transportern wird vermutet, daß die Kommunikation zwischen den Nukleotidbindungs- und Transmembrandomänen über die C-Loops und die EAA-Regionen erfolgt wie durch den Pfeil verdeutlicht wird. Bereiche, die an der Peptidbindung beteiligt sind, sind durch dicke Linien bzw. durch gefüllte Zylinder hervorgehoben (abgewandelt nach Abele & Tampé, 1999).

Die Peptidbindungstasche wird von TAP1 und TAP2 gemeinsam gebildet. Sowohl TAP1 als auch TAP2 lassen sich mit photoreaktiven Peptiden ATP-unabhängig markieren (Nijenhuis *et al.*, 1996a; Nijenhuis & Hämmerling, 1996b). Durch Experimente mit photoreaktiven radioaktiv markierten Peptiden konnten einige diskrete Regionen innerhalb der Transmembrandomänen von TAP1 und TAP2 eingegrenzt werden, die an der Peptid-

bindung beteiligt sind. Nach der partiellen Hydrolyse des TAP-Komplexes ließen sich die markierten TAP-Fragmente mit Hilfe von regiospezifischen Antikörpern identifizieren. Demnach sind neben den zum Zytosol orientierten, C-terminalen Schleifen von TAP1 und TAP2 die TM5 und TM6 von TAP1 sowie die TM4, TM5 und TM6 von TAP2 an der Peptidbindung beteiligt (Abb. 4). Aufgrund der Bedeutung der zytosolischen Seite der Transmembranhelizes wird spekuliert, daß diese eine Membranpore formen, an deren Öffnung die Peptide ATP-unabhängig binden, bevor sie ATP-abhängig durch die Membran transportiert werden.

Über den Transportmechanismus des TAP-Komplexes oder über potentielle Intermediate innerhalb des Transportzyklusses ist sehr wenig bekannt. Untersuchungen des TAP-Komplexes bei verschiedenen Temperaturen zeigten, daß der Transportprozeß unterhalb 15°C auf der Stufe der Peptidbindung quasi eingefroren werden kann. Die Peptidbindung ist im Gegensatz zum Peptidtransport ATP-unabhängig. So konnte sowohl die ATP-unabhängige kovalente Markierung des TAP-Komplexes mit photoreaktiven Peptiden (Androlewicz & Cresswell, 1994; Nijenhuis *et al.*, 1996a) als auch die spezifische Peptidassoziation an TAP-haltige Mikrosomen nachgewiesen werden (van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995). Deswegen wird von einem Minimalmodell für den TAP-vermittelten Peptidtransport ausgegangen. Demzufolge setzt sich der Peptidtransport aus einem ATP-unabhängigen Peptidbindungsschritt und einem ATP-abhängigen Peptidtranslokationsschritt zusammen (Abb. 5).

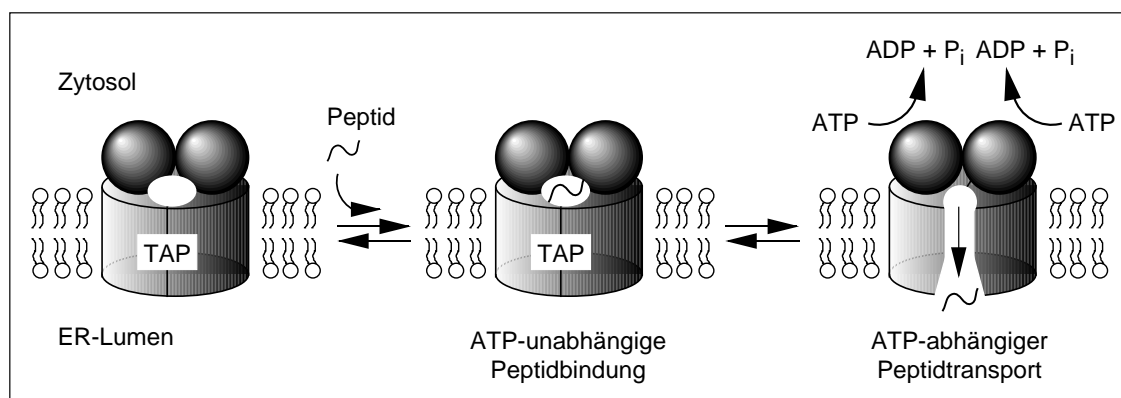


Abb. 5 Minimalmodell für den TAP-vermittelten Peptidtransport

Der TAP-vermittelte Peptidtransport besteht aus einem ATP-unabhängigen Peptidbindungsschritt und einem ATP-abhängigen Peptidtranslokationsschritt. Die Kugeln deuten die Nukleotidbindungsdomänen an, während der Zylinder die Transmembrandomänen repräsentiert.

Ein auffälliges Charakteristikum des TAP-Komplexes ist die große Zahl verschiedener Peptide, die transportiert werden können (Uebel *et al.*, 1997). Dies ist entscheidend, um das Repertoire der präsentierten Antigene nicht durch die Antigenprozessierung zu

limitieren (Uebel & Tampé, 1999). Der Antigenpeptid-Transporter transportiert Peptide mit einem Längenoptimum zwischen acht und zwölf Aminosäuren (Koopmann *et al.*, 1996), während Peptide mit acht bis sechzehn Aminosäuren bevorzugt gebunden werden (van Endert *et al.*, 1994). Eine ähnliche Längenverteilung zeigen die Peptide (8-10 AS), die von MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden werden (Falk *et al.*, 1990; Falk, *et al.*, 1991; Engelhard, 1994; Rammensee *et al.*, 1995). Darüberhinaus haben Untersuchungen mit kombinatorischen Peptidbibliotheken ergeben, daß lediglich die Aminosäuren an den ersten drei N-terminalen und an der C-terminalen Position die Bindungsaffinität beeinflussen. Die Seitenreste an den übrigen Positionen haben nur einen geringen Einfluß auf die Substraterkennung. An den Positionen 1 und 2 werden basische Aminosäuren bevorzugt, während aromatische Aminosäuren an Position 3 die Affinität zum TAP-Komplex erhöhen. Saure Reste an den Positionen 1 oder 3 und besonders ein Prolinrest an Position 2 reduzieren die Bindungsaffinität. Am C-Terminus werden aromatische und basische Aminosäuren bevorzugt (Uebel *et al.*, 1997; Uebel & Tampé, 1999). Der Einfluß des Peptidrückgrats wurde mit Hilfe von Peptidbibliotheken untersucht, die D-Aminosäuren enthielten. Demzufolge reduzieren D-Aminosäuren die Bindungsaffinität ausschließlich, wenn sie an den ersten drei N-terminalen bzw. der C-terminalen Position eingebaut werden (Uebel *et al.*, 1997). Zusätzlich zeigt sich, daß ein freier N- und C-Terminus strikte Voraussetzung für die Substraterkennung durch den TAP-Komplex darstellt (Momburg *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 1994). Aufgrund der vorliegenden Daten wird davon ausgegangen, daß der TAP-Komplex Peptide hauptsächlich über das Peptidrückgrat der ersten drei N-terminalen Aminosäuren sowie der C-terminalen Aminosäure und die Amino- bzw Carboxylgruppe der Termini bindet. Für die Aminosäuren zwischen den ersten drei und der letzten Position wurden kaum sterische Restriktionen gefunden. Dies wird zusätzlich dadurch unterstrichen, daß der TAP-Komplex sogar verzweigte Peptide mit einer Seitenkettenlänge bis zu 20 Aminosäuren bindet (Grommé *et al.*, 1997). Auch Peptide mit artifiziellen räumlich anspruchsvollen Seitenketten wie Fluorophoren (Uebel *et al.*, 1995; Blevitt *et al.*, 1999) oder Goldklustern mit einem Durchmesser von 1,4 nm (Neumann und Tampé, unveröffentlichte Daten) werden vom Antigenpeptidkomplex als Substrat erkannt.

4. Einfluß viraler Faktoren auf den TAP-Komplex

Der durch MHC-Klasse-I-Moleküle vermittelte Zweig des Immunsystems ist eine sehr effiziente Waffe gegen intrazelluläre Pathogene wie z.B. Viren. So ist es nicht überraschend, daß Viren im Laufe der Evolution Strategien entwickelt haben, der Immunüberwachung zu entgehen. Während kleinere Viren, die nur eine begrenzte Zahl von Genen in

ihrem Kapsid transportieren, ihre Immunerkennung hauptsächlich durch eine hohe Mutationsrate erschweren, exprimieren größere Viren Proteine, die direkt mit einzelnen Komponenten des Immunsystems interagieren und deren Funktion modulieren (Abb. 6).

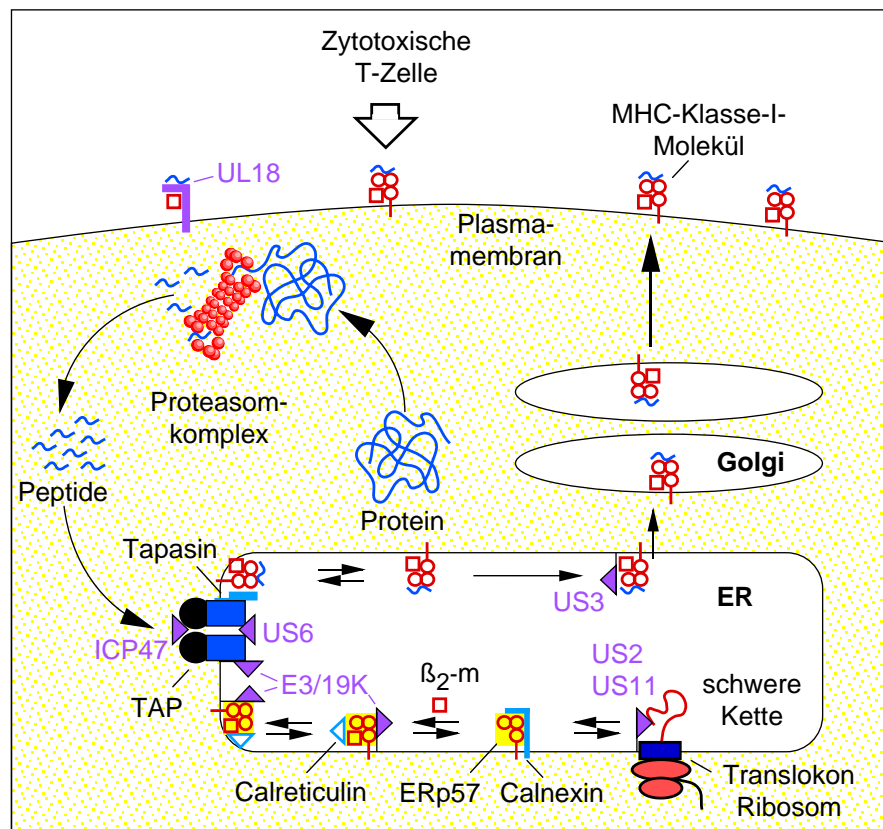


Abb. 6 Virale Strategien zur Blockierung der Antigenpräsentierung durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Zahlreiche Viren kodieren für Proteine (lila), die mit der Antigenpräsentierung durch MHC-Klasse-I-Moleküle interagieren. Die Bindung, der von dem humanpathogenen Zytomegalievirus (HCMV) kodierten Proteine US2 und US11, an die naszierende schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls führt zu ihrer Mislokation in das Zytosol. Das HCMV-Protein US3 und das Adenovirusprotein E3/19K binden MHC-Klasse-I-Moleküle und bewirken deren ER-Retention. Zusätzlich bindet E3/19K an Tapasin und verhindert die Assemblierung des Beladungskomplexes. Das HCMV-kodierte Protein UL18 wird in Assoziation mit der β_2 -m-Kette und einem Peptid auf die Zelloberfläche transportiert, um natürlichen Killerzellen eine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression vorzutäuschen. Das *Herpes Simplex Virus* (HSV) Protein ICP47 und das HCMV-Protein US6 inhibieren den Antigenpeptid-Transporter TAP.

So bindet das Adenovirus E3-kodierte 19 kDa Protein E3/19K an MHC-Klasse-I-Moleküle und verhindert ihre Präsentation auf der Zelloberfläche (Andersson *et al.*, 1985; Burgert & Kvist, 1985). Das E1a-Protein aus dem Adenovirusstamm Ad12 inhibiert dagegen die MHC-Klasse-I-Expression, indem es die Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B an das sogenannte H2TF1 Element der Klasse-I-Promotorregion erschwert (Meijer *et al.*, 1992). Die Expression der Gene US2 und US11 des humanpathogenen Zytomegalievirus (HCMV) führt zu einem retrograden Transport der schweren Kette

des MHC-Klasse-I-Moleküls in das Zytosol, wo sie vom Proteasomkomplex degradiert wird (Wiertz *et al.*, 1996a; Wiertz *et al.*, 1996b). Das HCMV-Genprodukt US3 bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und verhindert deren Transport auf die Zelloberfläche (York & Rock, 1996). Weil Zellen mit einer fehlenden MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression von sogenannten natürlichen Killerzellen lysiert werden, kodiert HCMV zusätzlich für das Protein UL18, das große Homologien zur schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls aufweist. Nach der Assoziation der β_2 -m-Kette und der Bindung eines antigenen Peptids wird dieser MHC-Klasse-I-ähnliche Komplex auf die Zelloberfläche transportiert, um dort natürlichen Killerzellen eine MHC-Klasse-I-Oberflächenbelegung vorzutauschen, ohne gleichzeitig zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (Fahnenstock *et al.*, 1995).

Aufgrund der entscheidenden Rolle des Antigenpeptid-Transporters innerhalb der Antigenprozessierung ist es nicht erstaunlich, daß auch der TAP-Komplex Ziel von viralen Immunmodulatoren ist. Die Infektion von humanen Fibroblasten mit *Herpes Simplex* Viren (HSV) führt zu einer verringerten Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Ähnlich wie in TAP-negativen Zellen akkumulieren peptid-unbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle im ER und im cis-Golgi (Hill *et al.*, 1994; York *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Mutagenesestudien konnte das aus 88 Aminosäuren bestehende, zytosolische HSV-Polypeptid ICP47 (*infected cell protein 47*), das in der Frühphase der Infektion exprimiert wird, für den scheinbaren Mangel an Peptiden im ER verantwortlich gemacht werden. So führt die Infektion mit ICP47-negativen HSV-Mutanten zu einer normalen Oberflächenexpression von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen, während auf der Oberfläche von Zellen, die mit rekombinanten ICP47-kodierenden Adenoviren infiziert wurden, deutlich weniger MHC-Klasse-I-Moleküle gefunden werden (York *et al.*, 1994). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß ICP47 den TAP-vermittelten Peptidtransport in das ER von Streptolysin O permeabilisierten Zellen inhibiert, indem es direkt an den TAP-Komplex bindet (Früh *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995). So läßt sich mit Antikörpern gegen TAP1 ein Komplex aus TAP1, TAP2 und ICP47 präzipitieren. Andererseits kann TAP1 und TAP2 mit einem Antikörper gegen ICP47 gefällt werden. Die Bindungstasche für ICP47 wird von TAP1 und TAP2 gemeinsam gebildet, da die Kopräzipitation des TAP-Komplexes und ICP47 nur in Gegenwart beider TAP-Untereinheiten beobachtet werden kann. ICP47 repräsentierte den ersten bekannten, natürlichen Inhibitor eines ABC-Transporters. *In vitro* Studien zeigten, daß ICP47 den Peptidbindungsschritt an den TAP-Komplex blockiert (Ahn *et al.*, 1996a; Tomazin *et al.*, 1996). So wird die Peptidassoziation an TAP-haltige Mikrosomen und die Markierung des TAP-Komplexes mit photoreaktiven Peptiden inhibiert, während die kovalente Kopplung von photoreaktivem ATP an den TAP-Komplex unbeeinträchtigt bleibt. Da die ICP47-Bindung an den Antigenpeptid-Transporter in Gegenwart einer hohen Peptidkonzentration verhindert wird, ist anzunehmen, daß ICP47 und Peptide um die

gleiche Bindungsstelle kompetitieren. ICP47 wird nicht in das ER transportiert. Weder mit Hilfe von Glykosylierungsanalysen noch sogenannter *Protease Protection Assays* konnte gezeigt werden, daß ICP47 in das ER-Lumen gelangt. Die hohe Bindungsaffinität von ICP47 zum humanen TAP-Komplex ($K_d = 42\text{-}52\text{ nM}$), die um das zwei- bis fünf-fache höher liegt als die der transportierten Peptide, erklärt die effektive Blockierung der Antigenprozessierung in HSV-infizierten humanen Zellen. Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf HSV-infizierten murinen Zellen ist dagegen nicht reduziert (Jennings *et al.*, 1985; York *et al.*, 1994). Die Transfektion von ICP47-exprimierenden humanen HeLa-Zellen mit murinem Antigenpeptid-Transporter führt sogar zu einer Normalisierung der Präsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen (Früh *et al.*, 1995). Diese deutliche Speziespezifität von ICP47 hat seine molekulare Ursache in einer 50 bis 100-fach schwächeren Bindungsaffinität gegenüber murinem TAP-Komplex (Ahn *et al.*, 1996b).

Neben dem HSV blockiert auch der HCMV den TAP-Komplex. Das Genom des HCMV kodiert für ein ganzes Arsenal von Proteinen, die die Antigenprozessierung beeinflussen. Um neben den bereits bekannten Immunsuppressoren US2, US3, US11 und UL18 weitere Proteine zu identifizieren, die die Immunerkennung des HCMV erschweren, wurden alle offenen Leserahmen der US-Region in HeLa bzw. HLA-A2⁻ 293 Nierenzellen exprimiert (Hengel *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1997). Die Synthese des 21 kDa ER-ständigen Transmembranglykoproteins US6 führte zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen und der Anhäufung von unbeladenen MHC-Klasse-I-Proteinen im ER und im cis-Golgiapparat. Koimmunopräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen US6 belegten, daß US6 an den Komplex aus TAP1, TAP2, Tapasin, der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, $\beta_2\text{-m}$ und dem Chaperon Calreticulin bindet. Vergleichbar zu ICP47 unterbricht US6 die Peptidversorgung der MHC-Klasse-I-Moleküle, indem es den TAP-vermittelten Peptidtransport in das ER inhibiert. Im Gegensatz zu ICP47 blockiert US6 allerdings nicht den Peptidbindungsschritt des Antigenpeptid-Transporters von der zytosolischen Seite, sondern verhindert den Peptidtransport durch eine noch nicht näher charakterisierte Wechselwirkung mit den ER-luminalen Domänen des TAP-Komplexes (Hengel *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1997).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) greift in das Kommunikationssystem des Immunsystems ein, das durch die Proteinklasse der Zytokine reguliert wird. Zu diesen werden die Interleukine und Interferone gezählt. So kodiert die Genregion BCRF1 für ein virales Protein (virales Interleukin-10, vIL-10), das 84 % Sequenzhomologie zu humanem Interleukin-10 (hIL-10) aufweist (Vieira *et al.*, 1991). Das vIL-10 übernimmt teilweise die Aufgaben des hIL-10 und moduliert auf diese Weise die Immunantwort. Neben der Hemmung der Zytokinsynthese (de Waal Malefyt *et al.*, 1991) und der Aktivitätserniedrigung der für das Immunsystem wichtigen Makrophagen (Moore *et al.*, 1993)

führt vIL-10 zu einer drastisch reduzierten Transkriptionseffizienz des TAP1-Gens. Transportstudien zeigten, daß die verringerte Anzahl funktionaler TAP-Komplexe eine direkte Auswirkung auf die Menge der transportierten Peptide und die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen hat (Zeidler *et al.*, 1997).

Kürzlich wurde entdeckt, daß auch das Adenovirus E3-kodierte Protein E19 neben seiner Funktion, MHC-Klasse-I-Moleküle im ER zurückzuhalten, auch die Peptidbeladung dieser Proteine stört. Mit Hilfe von Immunoprecipitationsstudien wurde gezeigt, daß E19 unabhängig an den TAP-Komplex und an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und dabei die Assemblierung des Beladungskomplexes verhindert (Bennett *et al.*, 1999).

5. Motivation und Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation sollten zwei Fragestellungen bearbeitet werden. Das erste Teilprojekt befaßte sich mit der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes, während sich das zweite Teilprojekt mit dem HSV-kodierten TAP-Inhibitor ICP47 beschäftigte.

5.1 Assemblierung des Peptid-TAP-Komplexes

Die Peptidbindung bildet den initialen Schritt für den Transportzyklus des Antigenpeptid-Transporters TAP. Zusätzlich ist dieser Schritt für die Substraterkennung verantwortlich. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes im Detail analysiert werden. Es sollte eine Technik entwickelt werden, die die Beobachtung der Peptid-TAP-Wechselwirkung in Echtzeit und unter homogenen Bedingungen erlaubt. Auf diese Weise wurde erhofft folgende Fragen zum Transportmechanismus des Antigenpeptid-Transporters beantworten zu können. Welche molekularen Vorgänge liegen diesem Prozeß zugrunde? Welcher Kinetik folgt die Peptidbindung? Was sind die treibenden Kräfte für die Formierung des Peptid-TAP-Komplexes? Gibt es essentielle Zwischenstufen? Hat die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes weitere Funktionen innerhalb des Transportzyklusses? Können die molekularen Ursachen für die erstaunliche Substratdiversität des Antigenpeptid-Transporters geklärt werden?

5.2 Der virale TAP-Inhibitor ICP47

Das 88 Aminosäuren lange Polypeptid ICP47 des *Herpes Simplex Virus* (HSV) blockiert den Peptidbindungsschritt des Antigenpeptid-Transporters TAP und verhindert so die Immunerkennung HSV-infizierter Zellen. In diesem Teilprojekt wurde nach essentiellen Regionen, strukturellen Aspekten und nach den molekularen Wirkprinzipien des viralen TAP-Inhibitors gefragt. Welche Sequenzabschnitte sind für die Aktivität von ICP47 entscheidend? Welche Aminosäuren sind essentiell? Gibt es ein kleinstes aktives Fragment, eine aktive Domäne von ICP47? Welche Struktur hat ICP47? Welche Rolle spielt die Struktur bei der Blockierung des TAP-Komplexes?

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Acetonitril (<i>gradient grade</i>)	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	National Diagnostics
AEBSF	Calbiochem
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Apyrase (<i>Grade VI</i> , aus der Kartoffel)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Concanavalin A-Sepharose	Sigma
Coomassie G	Sigma
1,4-Dithiothreitol	Merck
ECL-Kit	Amersham
EDTA	Merck
IgG (aus Rind)	Sigma
IgG, anti-Maus (aus Ziege), Peroxidase gekoppelt	Sigma
5-Iodacetamidofluoreszein	Molecular Probes
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Magermilchpulver	Fluka
α -Methylmannosid	Sigma
<i>Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce
Molekulargewichtsstandard, <i>prestained</i>	BioRad
Natriumiodid* (Iod-Isotop 125)	Amersham
Penicillin	Gibco
Pepstatin	Sigma
Pluronic F-68	Gibco
PMSF	Sigma
Sephadex G10	Pharmacia Biotech
Streptavidin	Gibco
Sucrose	Merck
TEMED	Serva
Trifluoressigsäure (<i>protein sequencing grade</i>)	Sigma
Trifluorethanol	Sigma
<i>Trypan Blue Stain</i>	Sigma
Tyrosin	Sigma

Falls nicht anders verzeichnet, wurden alle Chemikalien im höchsten Reinheitsgrad von Merck, Sigma oder Fluka bezogen.

Die verwendeten Peptide wurden von W. Kraas in der Gruppe von Prof. Jung (Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen), von der Peptidsynthese-einrichtung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried oder von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg nach der Fmoc-Methode synthetisiert.

1.2 Verbrauchsmaterial

ECL-Hyperfilm	Amersham
Einmal-Plastiksäulen (10 ml)	BIO-RAD
Einmal-Spritzen (1 ml)	Braun
Filter (0,45 µm, Acetonitril beständig)	Millipore
Filteraufsatz für 1 ml Einwegspritzen (Filter Typ HV, Porengröße 0,45 µm)	Millipore
<i>iodo-GEN Precoated Iodination Tubes</i>	Pierce
Kanülen (0,45 mm)	Braun
Kanülen (0,60 mm)	Braun
Zellkulturflaschen	Nuncolon
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher und Schuell (Obtitran BA-S 83)
Pipettenspitzen	Peske
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Falcon
96-well-Mikrotiterplatten	Greiner, Nuncolon
Whatman-3MM-Filterpapier	Kobe

1.3 Puffer

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

4x Auftragspuffer:	200 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	40 % (v/v)	Glyzerin
	8 % (w/v)	SDS
	0,06 % (w/v)	Bromphenolblau
	80 mM	DTT
Bindungspuffer:	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
		in PBS (pH 7,4)
Blockpuffer:	7 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,05 % (v/v)	Tween 20
	0,05 % (w/v)	NaN ₃
		in TBS-Puffer
Entwicklerlösung:	100 ml	2,5 % Na ₂ CO ₃
	40 µl	Formaldehyd
Färbelösung:	80 ml	10 % (NH ₄) ₂ SO ₄
		2 % H ₃ PO ₄
	20 ml	Methanol
	1 ml	5 % Coomassie G
		in Wasser
Fixierlösung:	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Kavitationspuffer:	250 mM	Sucrose
	25 mM	KOAc
	5 mM	MgOAc
	0,5 mM	CaOAc
	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
Konditionierer:	30 ml	Ethanol
	20 ml	2 M NaOAc (pH 6,0)
	2 ml	25 % Glutaraldehyd
	100 mg	NaS ₂ O ₃ x 5H ₂ O
	48 ml	Wasser
NP40-Lysepuffer:	150 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)

PBS:	150 mM	NaCl
	1,3 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄
		Der pH-Wert wurde durch das Verhältnis Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ eingestellt.
Protease-Inhibitormix:	50 µg/ml	AEBSF
	1 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	5 µg/ml	Pepstatin
	25 µl	Formaldehyd
	75 ml	Wasser
Stopplösung (Silberfärbung):	10 % (v/v)	Essigsäure
Stoppuffer (Iodierung):	2,4 mg/ml	Natriummetasulfit
	10 mg/ml	Tyrosin (gesättigte Lsg.)
	10 % (v/v)	Glyzerin in PBS (pH 7,4)
Sucrose-Puffer:	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	150 mM	KOAc
	5 mM	MgOAc
	1,3/2,0/2,5 M	Sucrose
TBS-Puffer:	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
TBS-T-Puffer:	0,05 % (v/v)	Triton X-100 in TBS-Puffer
TCA-Fix:	15 % (w/v)	TCA
	50 % (v/v)	Methanol
Transferpuffer:	39 mM	Glyzerin
	48 mM	Tris
	0,037 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol

1.4 Geräte

Brutschränke	Heraeus
CD-Spektrometer	ISA Jobin Yvon (Auto. Dichrograph Mark IV)
<i>Douncer</i> -Homogenisator (30 ml)	Braun Melsungen
<i>Douncer</i> -Homogenisator (10 ml)	Braun Melsungen
Entwicklermaschine	AGFA (Curix 60)
Fluoreszenz-ELISA-Meßgerät	bmG (POLARstar Galaxy)
Fluoreszenzspektrometer	Instruments S.A., HORIBA Group (FLUOROLOG-3)
Geldokumentationssystem	Amersham-Pharmacia (Hoefer SE 660)
γ -Zähler (MR480)	Packard (Cobra II)
Hämatozytometer	Brand
HPLC-Anlage	Kontron
Mikro-HPLC-System (SMART-System)	Pharmacia Biotech
Mikroskop	Mikroskop
Milli-Q-Wasser deionisierungsanlage	Zeiss (Axiovert 10)
Multipipette	Millipore
Quarzküvette (200 μ l) für CD-Spektroskopie	Millipore
Quarzküvette (500 μ l) für Fluoreszenz- und UV/Vis-Spektroskopie	Hellma
Quarzdreiecksküvette (1ml) für Fluoreszenz- spektroskopie	Hellma
<i>Reversed-phase</i> -Säule, analytisch (μ RPC C2/C18 SC 2.1/10)	Pharmacia Biotech
<i>Reversed-phase</i> -Säule, präparativ (Kontrosorb10 C18)	Kontron
Rotoren für Ultrazentrifugation	Beckman (SW 28.1, Ti 50)
Schüttelinkubatoren	Infors AG (HT)
<i>Semidry-Blot</i> -Apparatur	Eigenbau (Werkstatt des Max-Planck Instituts für Biochemie, Martinsried)
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments (Hera safe)
<i>Speed Vac</i> -Konzentrator	Buchofer
Spektralphotometer (UV/Vis)	Perkin Elmer (Lambda 2)
Suspensionszellkulturflaschen	Technomara
Tank- <i>Blot</i> -Apparatur	Eigenbau (Werkstatt des Max-Planck Instituts für Biochemie, Martinsried)
Thermomixer	Eppendorf (5430)
Ultraschallgenerator	Branson (Sonifier 250)

Ultrazentrifuge	Beckman (TLA-100, L8-60M)
UV/Vis-Spektrometer	Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000)
Vakuumstation (<i>Multiscreen Filtration System</i>)	Millipore
Waagen	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore (Milli-Q UF Plus)
Zentrifugen	Eppendorf (5415C, 5403), Heraeus (Omnifuge 2.ORS)

2. Zellkultur

Zur TAP-Expression wurden Sf9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) mit rekombinanten Bakuloviren infiziert, die die Gene für humanes (His)₆TAP1 und TAP2 enthielten (Meyer *et al.*, 1994). Die Insektenzellen wurden in SF900 II Medium kultiviert, das mit 10 % (w/v) fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 0,1 % (v/v) Pluronic F-68 und 100 U/ml Penicillin/Streptavidin supplementiert worden war.

2.1 Kultivierung von Insektenzellen

600 ml einer Sf9-Insektenzellsuspension wurden in 1,8 l Fernbachkolben bei 27°C und einer Zelldichte von 0,3 bis 2,5 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert. Um das Absetzen der Zellen zu verhindern, wurde die Suspension mit einer Geschwindigkeit von 60 rpm in einem Schüttelinkubator geschwenkt. Die Zelldichte wurde nach dem Anfärben der Zellen mit *Trypan-Blue-Stain* in einem Hämozytometer bestimmt.

2.2 Amplifikation von Bakuloviren

Um Bakuloviren zu amplifizieren, wurden 600 ml der Zellsuspension (1,3 10⁶ Zellen/ml) mit 1,5 ml eines *high titer* Virusstocks infiziert. 7 bis 14 Tage *post infection* (p.i.) wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 200 x g, 4°C). Der virushaltige Überstand wurde bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert.

2.3 TAP-Expression

Um den TAP-Komplex zu exprimieren, wurden 600 ml Insektenzellkultur (1,6 bis $2,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml) mit 50 ml eines *high titer* Stocks von rekombinanten Bakuloviren infiziert. 72 h p.i. erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (10 min, $1000 \times g$, 4°C). Das Zellpellet wurde einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und bei -20°C gelagert (Meyer *et al.*, 1994). Nach erfolgreicher Expression machte TAP einen Anteil von 0,2 bis 2 Gewichtsprozent des mikrosomalen Proteins aus. Für Kontrollexperimente wurden Insektenzellen analog mit Wildtyp-Bakuloviren infiziert.

3. Synthesen und Reinigungsverfahren

3.1 Reinigung von Peptiden

Die Rohprodukte aus der Peptidsynthese sowie die Produkte von Peptidmodifikationen wurden mit Hilfe von *reversed-phase*-Chromatographie gereinigt. Für kleine Peptidmengen ($< 0,5$ mg) wurden analytische C2/C18-*reversed-phase*-Säulen für das SMART-System verwendet. Große Mengen Peptids ($> 0,5$ mg) wurden mit Hilfe einer präparativen C18-*reversed-phase*-Säule und einer HPLC-Anlage aufgereinigt. Zur Elution der Substanzen wurde ein Gradient aus Milli-Q-Wasser (0,1 % (v/v) TFA) und Acetonitril (0,1 % (v/v) TFA) verwendet. Alle in der HPLC eingesetzten Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und filtriert ($0,45 \mu\text{m}$ Porengröße). Die Steilheit der Gradienten wurde dem Elutionsverhalten der zu trennenden Stoffe angepasst. Während das SMART-System nur mit einem UV/Vis-Detektor ausgerüstet ist, stand für die präparative HPLC-Anlage zusätzlich ein Fluoreszenzdetektor zur Verfügung. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und die Peptide in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Die Konzentration der Peptide wurde spektroskopisch (s. B.4.3.1) oder nach der BCA-Methode bestimmt (s. B.4.3.2). Die Identität aller Produkte wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie in den Gruppen von Prof. Dr. F. Lottspeich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) bzw. Prof. Dr. R. Thauer (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) überprüft.

3.2 Synthese von Fluoreszein-markierten Peptiden

Verschiedene Peptide wurden mittels regiospezifischer Thiolchemie mit dem Fluorophor Fluoreszein markiert. Hierfür wurde 1 mM des cysteinhaltigen Peptids mit 1,2 mM des sulfhydrylspezifischen 5-Iodacetamidofluoreszeins bei RT in PBS (pH 6,5), 20 % DMF inkubiert. Nach 2 h Reaktionszeit waren die Cysteinreste quantitativ zu Cysteinacetamidofluoreszein (Φ) umgesetzt. Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs und die Reinigung erfolgte über *reversed-phase*-Chromatographie (s. B.3.1).

3.3 Iodierung von Peptiden

3.3.1 Chloramin-T-Methode nach McConahey

Um Tyrosinreste von TAP-Liganden mit ^{125}I zu markieren ($^*\text{Y}$), wurden 15 nmol des Peptids mit 1 mCi Na^{125}I und 0,1 mg Chloramin-T in 90 μl 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) 1 min bei RT umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 90 μl Stoppuffer beendet.

Die ^{125}I -markierten Peptide wurde mit Hilfe von Gelfiltration gereinigt. Dazu wurden 4 g trockenes Sephadex G10 Material (Säulenvolumen von 8 ml) in 15 ml PBS (1 % (w/v) gegen PBS dialysiertes BSA, pH 7,4) aufgeschlämmt und in eine 10 ml Einmal-Plastiksäule gepackt. Nach Äquilibration der Säule mit 10 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) wurde der Iodierungsansatz auf die Säule aufgetragen und mit 500 μl Aliquots 200 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) eluiert. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde in einem γ -Zähler quantifiziert und die Peptidkonzentration der Fraktionen anhand der verwendeten Peptidmenge berechnet. Iodierte Peptide wurden bei 4°C gelagert und blieben über 2 Wochen stabil.

3.3.2 Chloramin-T-beschichtete Reaktionsgefäße

Um zu verhindern, daß das hydrophobe ICP47 und seine Derivate irreversibel an das Gelfiltrationsmaterial adsorbieren, wurde alternativ in Chloramin-T-beschichteten Glasreaktionsgefäßen iodiert. Dazu wurden 1,5 nmol ICP47 bzw. seine Derivate in 150 μl PBS (pH 7,4) aufgenommen und in ein sogenanntes *ODO-GEN Precoated Iodination Tube* überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Na^{125}I (0,1 mCi) gestartet und nach 20 min Inkubation bei RT durch Überführen der ICP47-Lösung in ein Eppendorfgefäß gestoppt. Überschüssiges Iod wurde durch Zugabe eines Volumen-

äquivalents 2 mg/ml Tyrosin, 2mM NaI in PBS (pH 7,4) abgefangen. Das iodierter ICP47 wurde bei 4°C gelagert und blieb über 2 Wochen stabil.

4. Biochemische Methoden

4.1 Vesikelpräparation

Die Sekundärstruktur von ICP47 wurde in Gegenwart von Vesikeln unterschiedlicher Lipidzusammensetzung untersucht. Dazu wurden die Lipide in Chloroform/Methanol (3/1) gelöst, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen und der entstandene Lipidfilm im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Lipide oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) rehydratisiert und mit einer Frequenz von 20 kHz und einer Generatorleistung von 40 W 6 min mit Ultraschall behandelt (5 min Pulsdauer 50 %, 1 min Pulsdauer 100 %). Um die Vesikel von Metallkontaminationen zu befreien, wurden sie einmal pelletiert (10 min, 23.000 x g, RT) und erneut in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen.

4.2 Mikrosomenpräparation

Die Untersuchung des TAP-Komplexes wurde an TAP-haltigen Mikrosomen durchgeführt. Dazu wurden Mikrosomen aus Insektenzellen isoliert, die mit rekombinanten Bakuloviren infiziert worden waren. 2 ml Zellpellet wurden in 5 ml Kavitationspuffer (1 mM DTT, 1:100 Protease-Inhibitormix) aufgenommen und in einem *Douncer*-Homogenisator durch 30-maliges Betätigen des Stempels aufgeschlossen. Der Vorgang wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Durch Zentrifugation (4 min, 200 x g, 4°C; anschließend 8 min, 700 x g, 4°C) wurden die Zellkerne und nicht-lysierte Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen (SW 28.1 Rotor) mit dem 5,5-fachen Volumen 2,5 M Sucrose (1 mM DTT, 1:100 Protease-Inhibitormix) vermischt und mit 8 ml 2 M Sucrose-Puffer, 5 ml 1,3 M Sucrose-Puffer und 3 ml Kavitationspuffer überschichtet. Nach der Ultrazentrifugation (über Nacht, 85.000 x g, 4°C) in einem SW 28.1 Rotor wurde die trübe Fraktion zwischen der 2 M und 1,3 M Sucrose-Schicht abgenommen, 1:1 mit PBS (1 mM DTT, pH 7,4) verdünnt und in einem Ti 50 Rotor pelletiert (20 min, 100.000 x g, 4°C). Das Pellet wurde in PBS (1 mM DTT, pH 7,4) resuspendiert, die Mikrosomen mit einem *Douncer*-Homogenisator vereinzelt, portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mikrosomen konnten bei -80°C mehrere Monate gelagert werden. Die Gesamtproteinmenge wurde mit

Hilfe der Absorption bei 280 nm (s. B.4.3.1) oder der BCA-Methode (s. B.4.3.2) bestimmt. Der TAP-Gehalt wurde mit einem Peptidsättigungsbindungsexperiment (s. B.4.7.1) ermittelt.

4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.3.1 Absorptionsspektroskopie

Die Konzentration von Fluoreszein-markierten Peptiden wurde mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 492 nm gemessen und die Konzentration mit Gleichung 1 berechnet ($\epsilon_{\text{Fluoreszein (492 nm)}} = 75.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$c = \frac{\text{Abs}}{\epsilon l} \quad \text{Gleichung 1}$$

Abs	Absorption bei Absorptionsmaximum
ϵ	Extinktionskoeffizient
l	Länge des Lichtwegs durch die Probe

Die Gesamtproteinkonzentration von mikrosomalen Präparationen wurde ebenfalls spektroskopisch ermittelt. Dazu wurden 5 μl einer mikrosomalen Stocklösung zu 595 μl PBS (1 % (w/v) SDS, pH 7,4) gegeben und deren Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette gemessen. Um der Absorption eine Proteinmenge zuordnen zu können, wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentration IgG bzw. BSA hergestellt.

4.3.2 BCA-Methode

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen bzw. Polypeptiden und deren Derivaten, die nicht mit einem Farbstoff markiert waren, wurde mit dem *Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit* nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Ca. 1 μg des zu untersuchenden Proteins bzw. Polypeptids wurde mit einem geeigneten Puffer auf 250 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 250 μl der BCA-Lösung und einstündiger Inkubation bei 60°C wurde die Absorption bei 562 nm in einem UV/Vis-Spektrometer gemessen. Als Referenz diente eine Mischung aus 250 μl des verwendeten Puffers und 250 μl BCA-Lösung. Für die Ermittlung der Eichgeraden wurden 0/0,4/0,8/1,2/1,6 und 2 μg IgG verwendet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der TAP-Expression und zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die denaturierende Gelelektrophorese (SDS *polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach Lämmli verwendet (Lämmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele benutzt. Die Größe der Minigele betrug 10 x 8 x 0,5 cm. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1/4 Volumen 4x Auftragspuffer 10 min auf 60°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker bei einer konstanten Spannung von 90 V (Sammelgel) und 120 V (Trenngel).

<u>Trenngel (10 %):</u>	25 ml	Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8)
	18,8 ml	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8)
	21,3 ml	Wasser
	112,5 µl	10 % (w/v) APS in Wasser
	75 µl	TEMED

<u>Sammelgel (5 %):</u>	7,1 ml	Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8)
	5,25 ml	1,0 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS (pH 6,8)
	28,6 ml	Wasser
	0,42 ml	10 % (w/v) SDS in Wasser
	420 µl	10 % (w/v) APS in Wasser
	42 µl	TEMED

die angegebenen Mengen reichen für acht Minigele

4.5 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine durch einstündiges Schwenken in TCA-Fix im Gel immobilisiert und konnten somit mit verschiedenen Methoden angefärbt werden.

4.5.1 Silberfärbung

Wenn nur sehr geringe Proteinmengen zur Verfügung standen wurden die Gele silbergefärbt. Mit dieser Methode lassen sich ca. 0,1 ng Protein/mm² sichtbar machen.

- 2 x 15 min Inkubation in Fixierlösung
- 20 min Inkubation mit Konditionierer
- 5 x 7 min Waschen mit deionisiertem Wasser
- 20 min Inkubation in Silberfärbelösung
- 2 x 5 s Waschen mit deionisiertem Wasser
- Inkubation in Entwicklerlösung bis die Banden die gewünschte Intensität aufweisen
- kurze Inkubation in Stopplösung

Alle Inkubationen wurden bei RT auf einem Gelschüttler durchgeführt.

4.5.2 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff

Die kolloidale Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988) weist eine Empfindlichkeit von ca. 1 ng Protein/mm² auf und ist damit 10-fach unempfindlicher als die Silberfärbung.

- über Nacht Inkubation in Färbelösung
- Entfernen des überschüssigen Farbstoffs durch 3 minütiges Waschen mit Tris/H₃PO₄ (pH 6,5)
- Entfärben des Hintergrunds mit 25 %igem (v/v) Methanol nach Sicht (mehrere Stunden)

Alle Inkubationen wurden auf einem Gelschüttler bei RT durchgeführt.

4.6 Immunoblot

Mit Hilfe von *Immunoblots* wurden nach der Gelelektrophorese einzelne Proteine selektiv angefärbt. Dazu wurden die Proteine aus einem Polyacrylamidgel mit dem *Tank-Blot*- oder dem *Semidry*-Verfahren auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran transferiert und dort mit Antikörpern nach der ECL-Methode (*enhanced chemolumineszenz*) sichtbar gemacht.

4.6.1 Tank-*Blot*

Gel und Membran wurden zwischen *Whatman*-3MM-Filterpapier und Schaumgummi-polster in ein Haltegitter eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Tank-*Blot*-Apparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 18 V.

4.6.2 *Semidry-Blot*

Gel und Membran wurden zwischen mit Transferpuffer getränkte *Whatman*-3MM-Filterpapier gelegt und in eine *Semidry-Blot*-Apparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte über 1 bis 2 h bei 15 V.

4.6.3 ECL-Färbung

Zur Sichtbarmachung von gewünschten Proteinen auf der Nitrozellulosemembran wurde die sehr empfindliche ECL-Methode verwendet.

- 1 h Inkubation in Blockpuffer
- 2 h Inkubation der Membran mit erstem Antikörper
TAP1 1:5 148.3 (Meyer *et al.*, 1994); TAP2 1:5 435.3 (van Endert *et al.*, 1994)
- 5 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen
- 1 h Inkubation mit 1:10.000 sekundärem Antikörper
(anti-Maus IgG gekoppelt mit Peroxidase)
- 5 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen

Die Entwicklung des *Blots* erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des ECL-*Kits* und ECL-Hyperfilms.

4.7 Affinitätsbestimmung von TAP-Liganden

4.7.1 Sättigungsbindungsexperiment

Mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten wurden die Affinitäten von ^{125}I - oder Fluoreszenz-markierten Peptiden bzw. ICP47-Derivaten bestimmt (nach Uebel *et al.*, 1995). Zusätzlich läßt sich mit dieser Methode die TAP-Konzentration einer mikrosomalen Präparation ermitteln. Dazu wurden in 150 μl Bindungspuffer steigende Konzentrationen des markierten Liganden mit TAP-haltigen Mikrosomen (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gesamtprotein) auf Eis inkubiert. Bei Peptiden betrug die Inkubationszeit 15 min, während ICP47-Derivate 45 min für die Einstellung des Bindungsgleichgewichts benötigten. Ungebundene Liganden wurden durch zweimaliges Waschen der Mikrosomen abgetrennt. Dazu wurden die Mikrosomen mit eiskaltem Bindungspuffer auf 500 μl aufgefüllt, pelletiert (8 min, 12.000 x g, 4°C), erneut in 500 μl eiskaltem Bindungspuffer resuspendiert und ein zweitesmal zentrifugiert (8 min, 12.000 x g, 4°C). Bei der Verwendung von ^{125}I -markierten Liganden wurde direkt die Mikrosomen assoziierte Radioaktivität mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert. Bei der Verwendung von Fluoreszenz-markierten Peptiden wurde das Mikrosomenpellet in 600 μl Bindungspuffer (1 % (w/v) SDS) lysiert und die Fluoreszenzemission gemessen ($\lambda_{\text{em/ex}} = 470/515 \text{ nm}$). Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe von Proben streulichtbereinigt, die kein Fluoreszenz-markiertes Peptid enthielten. Der Anteil unspezifischer Bindung wurde in Gegenwart eines 400-fachen Überschusses an unmarkierten Liganden bestimmt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d und der maximalen Anzahl an Bindungsplätzen B_{max} wurde die Menge gebundenen Peptids B gegen die Anfangskonzentration $[L]$ des markierten Liganden aufgetragen und mit Gleichung 2 approximiert. Während der K_d -Wert als Maß für die Affinität des Liganden verwendet wird, gibt B_{max} die Zahl der eingesetzten TAP-Moleküle an.

$$B = \frac{B_{\text{max}}[L]}{K_d + [L]} \quad \text{Gleichung 2}$$

B	Menge an gebundenem TAP-Ligand
B_{max}	maximale Menge an TAP-gebundenen Ligand
$[L]$	Konzentration des Liganden
K_d	Dissoziationskonstante

4.7.2 Konkurrenzexperiment

Zur indirekten Bestimmung der Affinität von TAP-Liganden und zur Überprüfung der Aktivität verschiedener ICP47-Varianten wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt (nach Uebel *et al.*, 1995). Bei dieser Methode konkurrieren die Liganden mit einem markierten Reporterpeptid um die Bindungsplätze. Dies hat den Vorteil, daß die aufwendige Markierung der untersuchten Liganden entfällt.

Dazu wurde in 150 µl Bindungspuffer eine steigende Menge Ligand mit 100 nM Reporterpeptid und TAP-haltigen Mikrosomen (50 µg/ml Gesamtprotein) 45 min auf Eis inkubiert. Als Reporterliganden wurden die Peptide RR*YQKSTEL oder RRYΦKSTEL verwendet. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Peptid bestimmt. Analog zum Sättigungsbindungs-experiment wurde ungebundenes Reporterpeptid abgetrennt (siehe B.4.7.1) und die Mikrosomen assoziierte Radioaktivität bzw. Fluoreszenz gemessen. Anschließend wurde die Bindungsinhibition mit Hilfe von Gleichung 3 berechnet.

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \times \left(1 - \frac{B_i - H}{B_o - H} \right) \quad \text{Gleichung 3}$$

B_i Menge an gebundenem Reporterpeptid in Gegenwart der Konkurrentkonzentration i
 H unspezifische Bindung des Reporterpeptids
 B_o Menge an gebundenem Reporterpeptid in Abwesenheit eines Konkurrents

Die Inhibition der Reporterpeptidbindung wurde gegen die Konkurrentkonzentration aufgetragen. Durch Approximation mit Gleichung 4 wurde die Konzentration bestimmt, bei der 50 % der Reporterpeptidbindung inhibiert wurden (IC_{50}).

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \times \left(\frac{\frac{[L]}{IC_{50}}}{\frac{[L]}{IC_{50}} + 1} \right) \quad \text{Gleichung 4}$$

IC_{50} Konkurrentkonzentration bei 50 % Inhibition der Reporterpeptidbindung

Die IC_{50} -Werte von unbekannten Liganden ließen sich durch den Vergleich mit IC_{50} -Werten von bekannten Liganden in K_d -Werte umrechnen.

4.8 Transportexperiment

Mit Hilfe von Transportexperimenten wurde der TAP-vermittelte, ATP-abhängige Peptidtransport untersucht. In 150 µl Bindungspuffer wurde 300 nM 125 Iod-markiertes Peptid bzw. Fluoreszenz-markiertes Reporterpeptid mit TAP-haltigen Mikrosomen (50 µg/ml Gesamtprotein) und 3 mM ATP 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Peptidtransport durch Zugabe von 350 µl eiskaltem Bindungspuffer gestoppt und TAP-gebundene Reporterpeptide durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses von unmarkiertem Peptid verdrängt. Analog zum Sättigungsbindungs-experiment (s. B.4.7.1) wurden die Mikrosomen gewaschen und die transportierten Peptide quantifiziert. Um die ATP-Abhängigkeit und die Spezifität des Transports für Peptide zu überprüfen, wurde in Kontrollansätzen ATP durch ADP ersetzt bzw. ein 400-facher molarer Überschuß von unmarkiertem Peptid zugegeben.

Da Mikrosomen einen wenig charakterisiertes Peptidexportsystem besitzen, wurde zusätzlich eine zweite Variante des Transportexperiments verwendet (verändert nach Neefjes *et al.*, 1993). Hierbei wurde die Glykosylierungsmaschinerie des ER ausgenutzt. Als Reporterpeptide dienten 125 Iod- bzw. Fluoreszenz-markierte Peptide, die zusätzlich die Erkennungssequenz für N-Glykosylierung NXT/S enthielten. Weil Peptide ausschließlich innerhalb der Mikrosomen glykosyliert werden, wurde die Glykosylierung als Marker für den Transport verwendet. Glykosylierte und somit transportierte Peptide konnten an Concanavalin A-Sepharose gebunden und quantifiziert werden. Dazu wurde 300 nM Reporterpeptid bei 37°C in 150 µl Bindungspuffer mit TAP-haltigen Mikrosomen (50 µg/ml Gesamtprotein) inkubiert. Nach 3 min wurde ein 400-facher molarer Überschuß an glykosylierbarem, unmarkiertem Kompetitorpeptid zugegeben, um den Transport des Reporterpeptids zu stoppen und die Glykosylierungsmaschinerie abzusättigen. Anschließend wurden die Mikrosomen in 1 ml NP40-Lysepuffer lysiert, mit 75 µl äquilibrierter Concanavalin A-Sepharose gemischt und 1,5 h bei 4°C auf einem Überkopfrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Sepharose mit je 1 ml NP40-Lysepuffer (1 min, 500 x g, 4°C) wurde das spezifisch gebundene Reporterpeptid mit 1 ml 200 mM α -Methylmannosid in NP40-Lysepuffer 1 h bei 4°C auf einem Überkopfrad eluiert. Das eluierte Peptid wurde mit einem γ -Zähler bzw. Fluoreszenzspektrometer quantifiziert.

5. Biophysikalische Methoden

5.1 Assoziations- und Dissoziationskinetik des Peptid-TAP-Komplexes

Um die Peptid-TAP-Assoziation und Dissoziation zu untersuchen, wurden Fluoreszein-markierte Peptide verwendet, deren Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex/em}} = 470/515 \text{ nm}$) sich durch die Bindung an den TAP-Komplex deutlich gelöscht wird. Dazu wurde in 900 μl Bindungspuffer das Fluoreszein-markierte Peptid vorinkubiert, bis ein stabiles Fluoreszenzsignal (Drift der Fluoreszenz $< 50 \text{ cps/min}$) beobachtet wurde. Dies war notwendig, weil Fluoreszenzpeptide teilweise an die Oberfläche der Quarzküvette adsorbierten. Anschließend wurde der Assoziationsprozeß durch Zugabe von TAP-haltigen Mikrosomen in 100 μl Bindungspuffer gestartet und der Verlauf des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet. Durch ATP-Depletion der Mikrosomen mit 0,03 U/ μl Apyrase wurde sichergestellt, daß ausschließlich Peptidbindung und nicht Peptidtransport beobachtet wurde. Nachdem sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte (Drift der Fluoreszenz $< 50 \text{ cps/min}$), wurde die Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes durch Zugabe eines 1000-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Peptid induziert.

Da diese Methode Messungen in trüben mikrosomalen Lösungen erforderte, mußten besondere Meßbedingungen gewählt werden. Der Einfluß von Streulicht wurde durch die Verwendung eines Fluorometers mit Doppelmonochromatoren reduziert. Zusätzlich wurde bei einer geringen Spaltbreite von 3 nm gemessen. Der innere Filtereffekt wurde durch die Verwendung von Dreiecksfluoreszenzküvetten vermieden, die den Weg des Anregungs- und des Emissionslichts verkürzen. Durch eine miniaturisierte Magnet-rührereinheit wurde das Absetzen von Mikrosomen verhindert. Die Temperatur konnte mit Hilfe eines zirkulierenden Wasserbads kontrolliert werden.

Der zeitabhängige Verlauf der Fluoreszenzemission $F(t)$ wurde mit den mono-exponentialen Gleichungen 5 für die Assoziation und 6 für die Dissoziation approximiert.

$$F(t) = \Delta F_{\text{eq}} e^{-k_{\text{app}} t} + F_{(t=\infty)} \quad \text{Gleichung 5}$$

$F(t)$	Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt t
ΔF_{eq}	Fluoreszenzänderung nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
t	Zeit
$F(t=\infty)$	Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt $t=\infty$

$$F(t) = \Delta F_{\text{eq}} \left(1 - e^{-k_{\text{diss}} t} \right) + F_{(t=0)} \quad \text{Gleichung 6}$$

k_{diss}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
$F(t=0)$	Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt $t=0$

5.2 Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur von ICP47 wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie in Gegenwart von verschiedenen Lipidmimetika bzw. Lipidvesikeln untersucht. Alle Messungen wurden in 1 mm Quartz-Suprasil Küvetten durchgeführt. Nach 45 min Vorinkubation der Vesikel (Lipidkonzentration 3,0 mM) mit 16 μ M ICP47 in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurden die Spektren aufgenommen. Die Temperatur der Proben wurde mit einem zirkulierendem Wasserbad kontrolliert. Jedes Spektrum wurde zwischen 195 bis 250 nm mit einer Schrittweite von 0,1 nm und einer Integrationszeit von 0,1 s aufgezeichnet. Zur Glättung der Spektren wurden jeweils 10 Einzelspektren gemittelt. Für die Hintergrundkorrektur wurden Spektren der gleichen Lösungen in Abwesenheit von ICP47 verwendet.

C. Ergebnisse

1. Kinetische und thermodynamische Analyse der Peptid-TAP-Assoziation

Die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes stellt den initialen Schritt des Peptidtransports dar. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Mechanismus dieser essentiellen Stufe innerhalb des Transportzyklusses untersucht. Zu Beginn wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe die Wechselwirkung zwischen dem Antigenpeptid-Transporter TAP und Peptid in Echtzeit und unter homogenen Bedingungen beobachtet werden konnte. Da sich mit Hilfe des umgebungssensitiven Fluorophors Fluoreszein bereits geringe Änderungen des pH-Werts oder der Polarität in der Mikroumgebung der Sonde detektieren lassen (Ohkuma & Poole, 1978), wurden verschiedene Peptide mit Fluoreszein markiert und deren Fluoreszenzsignal während der Wechselwirkung mit TAP analysiert.

1.1 Fluoreszein-markierte Peptide werden vom TAP-Komplex gebunden und transportiert

Als Modellpeptid für die Untersuchung der Peptid-TAP-Wechselwirkung wurde aufgrund seiner hohen Affinität zu TAP das HLA-B27 Epitop RRYQKSTEL gewählt. Um die regiospezifische Markierung mit Fluoreszein zu ermöglichen, wurden Varianten dieses Epitops synthetisiert, bei denen jeweils eine Aminosäure durch ein Cystein ersetzt worden war. Mit Hilfe der thiolreaktiven Verbindung 5-Iodacetamidofluoreszein wurden diese Cysteinreste zu Cysteinacetamidofluoreszein (Φ) umgesetzt.

Um den Einfluß der eingeführten Sonde auf die Substraterkennung durch TAP zu überprüfen, wurde die Bindungsaffinität jedes einzelnen Fluoreszeinpeptids mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten bestimmt. Dafür wurden TAP-haltige Mikrosomen in Abwesenheit von ATP mit einer steigenden Konzentration der verschiedenen Fluoreszein-markierten Peptide inkubiert, anschließend ungebundenes Peptid durch Waschen der Mikrosomen entfernt und die Mikrosomen assoziierten Peptide fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert. Unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses von unmarkiertem Peptid RRYQKSTEL gemessen. Wie exemplarisch für das Peptid RRY Φ KSTEL gezeigt (Abb. 7A), wurde die Menge TAP-gebundenen Peptids auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge bezogen, gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante K_d durch Approximation mit Gleichung 2 bestimmt. Für das Peptid RRY Φ KSTEL wurde eine Dissoziationskonstante

K_d von 93 ± 9 nM erhalten, die gut mit der von ^{125}I -markiertem Peptid übereinstimmt (Uebel *et al.*, 1995).

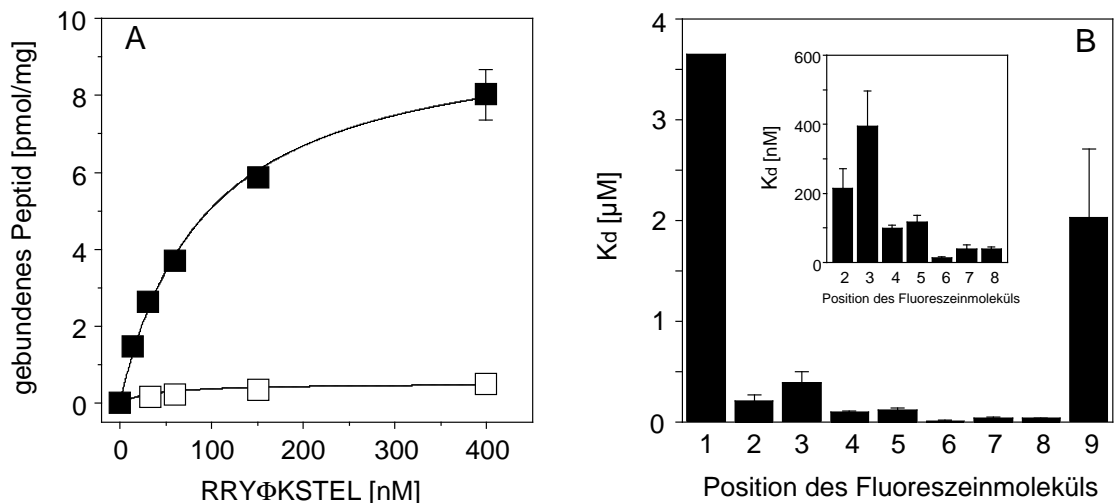


Abb. 7 Fluoreszein-markierte Peptide werden vom TAP-Komplex gebunden

(A) TAP-haltige Mikrosomen wurden mit einer steigenden Konzentration RRYΦKSTEL in Ab- (■) und Anwesenheit (□) eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Peptid 15 min auf Eis inkubiert. Nach intensivem Waschen der Mikrosomen wurden diese lysiert und Mikrosomen assoziierte, Fluoreszein-markierte Peptide quantifiziert ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Die Menge gebundener Peptide pro mikrosomalem Gesamtprotein wurde gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und mit Hilfe von Gleichung 2 approximiert. Für das Peptid RRYΦKSTEL wurde eine Dissoziationskonstante von 93 ± 9 nM bestimmt. (B) Jede Aminosäure des Peptids RRYQKSTEL wurde durch Cysteinacetamidofluoreszein substituiert und die Affinität der modifizierten Peptide mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten bestimmt. Der Einschub zeigt die Dissoziationskonstanten K_d der Peptide im Detail, die an Position 2 bis 8 markiert sind. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Der Vergleich aller markierten Peptide zeigte, daß die Position des Fluoreszeinmoleküls die Affinität beeinflusst (Abb. 7B). Während das Fluoreszeinmolekül an Position 4, 5, 6, 7 oder 8 die Affinität des Epitops zu TAP nicht verändert oder sogar erhöht, binden Peptide, die das Cysteinacetamidofluoreszein am N- oder C-Terminus tragen nur mit äußerst geringer Affinität. Epitope, die das Cysteinacetamidofluoreszein an Position 2 und 3 enthalten, zeigen eine zwei- bis vierfach reduzierte Affinität zum TAP-Komplex. Diese Beobachtungen stimmen mit dem Peptiderkennungsmotiv des TAP-Komplexes überein. Demnach fixiert der Antigenpeptid-Transporter Peptide lediglich an den ersten drei N-terminalen und der C-terminalen Aminosäure, während für die Aminosäuren zwischen diesen Bereichen nur geringe sterische Restriktionen bestehen (Uebel *et al.*, 1997).

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob Fluoreszein-markierte Peptide von TAP transportiert werden. Da Mikrosomen ein schlecht charakterisiertes Peptidexportsystem besitzen, wurde der Peptidtransport mit Hilfe der ER-ständigen Glykosylierungsmaschinerie nachgewiesen (Neefjes *et al.*, 1993). Um ein Peptid zu erzeugen, das die N-

Glykosylierungskonsensussequenz NXT trägt, wurde das Lysin des natürlichen Epitops RRYQKSTEL durch ein Asparagin ersetzt. Zusätzlich wurde das Cysteinacetamido-fluoreszein an Position 8 und nicht in direkter Nachbarschaft zum Asparaginrest eingebaut, um eine Blockierung der Glykosylierungsmaschinerie zu verhindern.

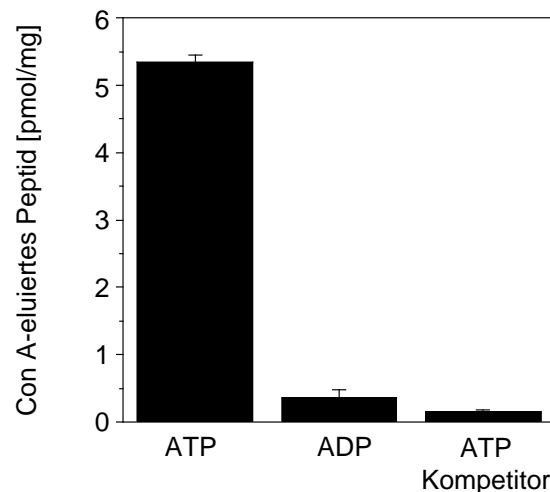


Abb. 8 Fluoreszein-markierte Peptide werden vom TAP-Komplex transportiert

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 300 nM RRYQNST Φ L in Anwesenheit von 3 mM ATP oder ADP 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosomen lysiert und glykosylierte und somit transportierte Peptide mit Con A-Sepharose isoliert. Anschließend wurden die Peptide mit α -Methylmannosid eluiert und fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Die Spezifität des Transports für Peptide wurde in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses von unmarkiertem Peptid überprüft. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Das so erhaltene Peptid RRYQNST Φ L wurde in Anwesenheit von ATP bzw. ADP mit TAP-haltigen Mikrosomen inkubiert. Glykosyliertes und somit transportiertes Peptid wurde durch die Bindung an Con A-Sepharose isoliert und anschließend quantifiziert. Wie in Abbildung 8 gezeigt, konnte eindeutig ein ATP-abhängiger Transport des Fluoreszein-markierten Peptids nachgewiesen werden. Die Blockierung des Peptidtransports in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid bestätigte, daß es sich um einen peptidspezifischen Prozeß handelt. Sowohl aus den Sättigungsbindungsexperimenten als auch aus den Transportstudien geht hervor, daß Fluoreszein-markierte Peptide, die die Sonde an einer geeigneten Position tragen, vom Antigenpeptid-Transporter TAP uneingeschränkt als Substrat erkannt werden. Somit können diese Peptide für die Untersuchung der Peptid-TAP-Wechselwirkung verwendet werden.

1.2 Fluoreszenzlöschung TAP-gebundener Peptide

Da die Fluoreszenz von Fluoreszein sehr empfindlich auf Änderungen des pH-Werts oder der Polarität reagiert (Ohkuma & Poole, 1978), wurde untersucht, inwiefern sich das Emissionssignal der Fluoreszein-Peptide durch die Bindung an den TAP-Komplex verändert. Dafür wurden TAP-haltige Mikrosomen mit RRYΦKSTEL in einer Fluoreszenzküvette gemischt und das Fluoreszenzsignal zeitabhängig aufgezeichnet. Die Experimente wurden bei 10°C durchgeführt, um eine vorzeitige Desaktivierung des TAP-Komplexes zu vermeiden.

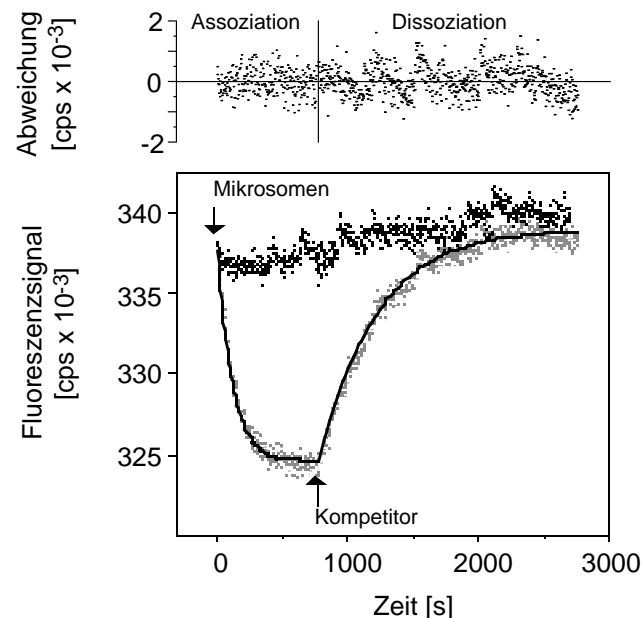


Abb. 9 Reduktion des Fluoreszenzsignals von RRYΦKSTEL durch Bindung an den TAP-Komplex

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 40 nM RRYΦKSTEL in Abwesenheit von ATP bei 10°C gemischt und die Fluoreszenzemission detektiert ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Dazu wurde alle 3 s ein Datenpunkt aufgezeichnet (graue Punkte). Die TAP-Konzentration betrug 2 nM. Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts wurde die Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses des Kompetitors RRYQKSTEL beobachtet. Anschließend wurde das zeitabhängige Fluoreszenzsignal mit Hilfe der Gleichungen 5 und 6 approximiert (durchgezogene Linien). Die TAP-Abhängigkeit der Fluoreszenzänderung wurde mit Kontrollmikrosomen überprüft, die kein TAP enthielten (schwarze Punkte). Der obere Teil der Abbildung zeigt die Abweichung der gemessenen Datenpunkte von der approximierten monoexponentiellen Kurve.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, führte die Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes zu einer signifikanten Abnahme des Fluoreszenzsignals. Nachdem sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte, wurde durch Zugabe eines 400-fachen Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid die Dissoziation des Fluoreszein-Peptids vom TAP-Komplex initiiert. Innerhalb von 20 min erreichte die Fluoreszenzemission ihren

Ausgangswert. Durch Zugabe des TAP-spezifischen Inhibitors ICP47 (Daten nicht gezeigt) oder mit Hilfe von Kontrollmikrosomen, die kein TAP enthielten (Abb. 9), wurde nachgewiesen, daß ausschließlich der Antigenpeptid-Transporter TAP für die Reduktion des Fluoreszenzsignals verantwortlich ist. Um sicherzustellen, daß die Veränderung der Fluoreszenzemission durch Assoziation bzw. Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes und nicht durch Peptidtransport verursacht wird, wurden alle Experimente in Abwesenheit von ATP durchgeführt.

Sowohl die Geschwindigkeit der Assoziation als auch der Dissoziation ließen sich mit den monoexponentialen Gleichungen 5 und 6 approximieren (Abb. 9). Wie im oberen Teil der Abbildung 9 gezeigt, wurde eine Gleichverteilung der gemessenen Datenpunkte um die approximierte Kurve festgestellt. Die Möglichkeit die apparente Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation k_{app} und die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation k_{diss} zu quantifizieren, erlaubte die kinetische Analyse der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes. Die Fluoreszenzänderung nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts ΔF_{eq} reflektiert die Menge gebundenen Peptids verwendet.

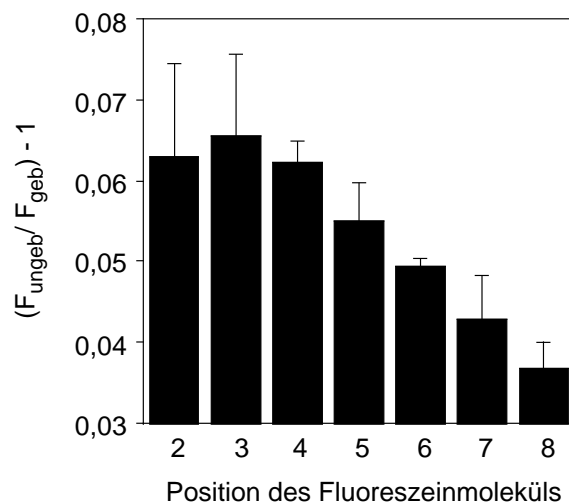


Abb. 10 Die Fluoreszenzlöschung ist von der Position des Cysteinacetamidofluoreszeins abhängig

Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der Position des Cysteinacetamidofluoreszeins zu untersuchen, wurde das Emissionssignal ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm) von $1,2 \mu\text{M}$ Fluoreszein-Peptid nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts (F_{geb}) und nach Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitor (F_{ungeb}) ins Verhältnis gesetzt. Die Experimente wurden bei 10°C in Abwesenheit von ATP und einer TAP-Konzentration von 30 nM durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

In einem zweiten Satz von Experimenten wurde die Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Position des Cysteinacetamidfluoreszeins innerhalb der Peptidsequenz RRYQKSTEL untersucht. Dafür wurden die Fluoreszenzsignale nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts (F_{geb}) bzw. in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid (F_{ungeb}) ins Verhältnis gesetzt. Alle Fluoreszein-Peptide wurden in der Sättigungskonzentration des Peptids mit der geringsten Affinität (RR Φ QKSTEL) eingesetzt, um für jedes Peptidderivat die maximale Belegung der Bindungsplätze zu gewährleisten. Für Peptidderivate, die das Fluoreszeinmolekül an Position 2, 3 oder 4 trugen, wurde die deutlichste Reduktion des Fluoreszenzsignals beobachtet. Während die Fluoreszenzlöschung an diesen Positionen vergleichbar war, nahm der Unterschied zwischen F_{geb} und F_{ungeb} schrittweise ab je weiter C-terminal die Fluoreszenzmarkierung eingeführt worden war (Abb. 10). Peptide, die den Fluorophor an Position 1 oder 9 trugen, konnten aufgrund ihrer geringen Affinität zu TAP nicht untersucht werden. Somit ist anzunehmen, daß sich die Mikroumgebung während des Bindungsprozesses an den TAP-Komplex im N-terminalen Bereich eines Peptids drastischer ändert als in seiner C-terminalen Region.

1.3 Peptidbindung an den TAP-Komplex ist ein Zweischnittprozeß

Um potentielle Zwischenschritte bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes zu identifizieren, wurde die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration analysiert. Für diese Studien wurde das Peptid RRY Φ KSTEL verwendet, da es sowohl eine deutliche Fluoreszenzlöschung (Abb. 10) als auch eine hohe Bindungsaffinität (Abb. 7B) aufweist. In allen Experimenten wurde die TAP-Konzentration so gering wie möglich gehalten (2 nM), um pseudo-erste-Ordnung Bedingungen zu gewährleisten. Wie in Abbildung 11 gezeigt, nahm die Assoziationsgeschwindigkeit mit steigender Peptidkonzentration zu, während die Dissoziationsgeschwindigkeit konzentrationsunabhängig war. Gleichzeitig näherte sich die Fluoreszenzänderung nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts ΔF_{eq} bei hohen Peptidkonzentrationen einem Sättigungswert. Sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation zeigte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich einen monoexponentialen Verlauf. Mit Hilfe der Gleichungen 5 und 6 wurden die exakten Werte für die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{app} und die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation k_{diss} bestimmt und in Abbildung 12A dargestellt.

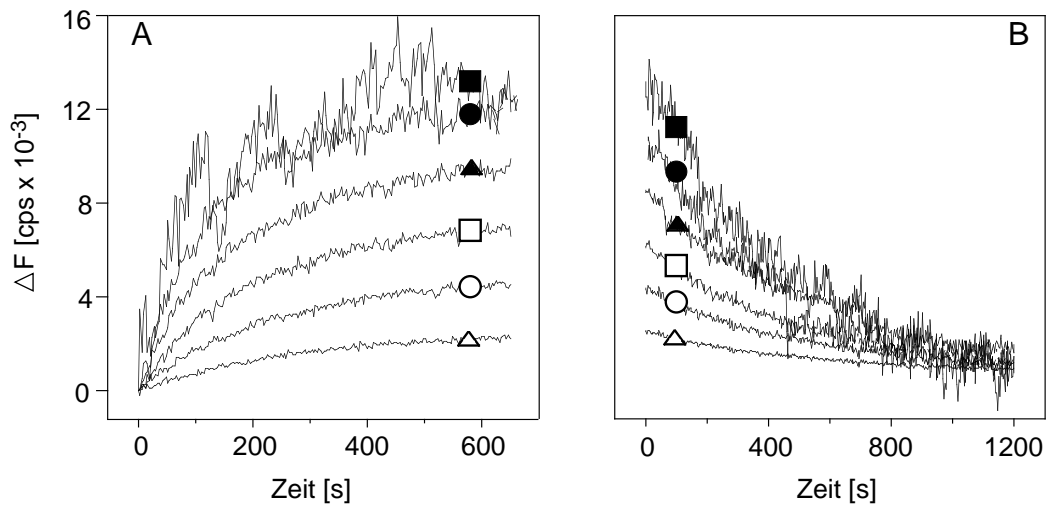


Abb. 11 Konzentrationsabhängigkeit der Assoziation und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes

(A) TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 2,5 (Δ), 5,0 (\circ), 10 (\square), 20 (\blacktriangle), 40 (\bullet) und 80 nM (\blacksquare) des Peptids RRY Φ KSTEL bei 10°C gemischt und die Fluoreszenzänderung ($\Delta F = F(t=0) - F(t)$) gegen die Zeit aufgetragen ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Die TAP-Konzentration betrug 2 nM. (B) Nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts wurde die Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid gemessen. Es wurde die zeitabhängige Differenz zwischen dem Fluoreszenzsignal nach vollständiger Dissoziation F_{eq} und der Fluoreszenz zum Zeitpunkt t ($\Delta F = F_{eq} - F(t)$) aufgetragen.

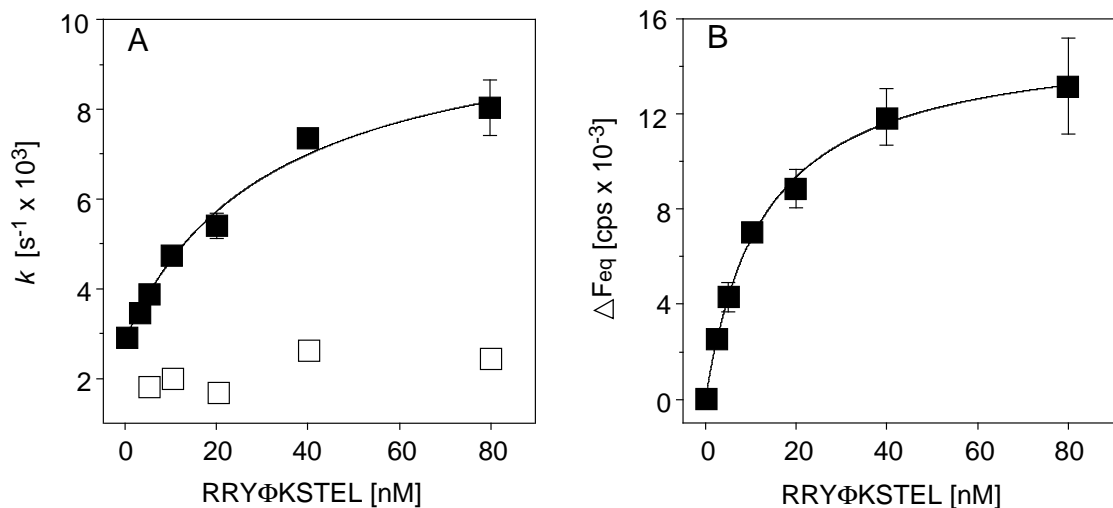
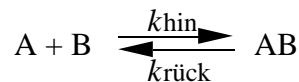


Abb. 12 Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Peptid-TAP-Wechselwirkung

(A) Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{app} (\blacksquare) und die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation k_{diss} (\square) wurden bei 10°C für unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids RRY Φ KSTEL bestimmt. Die durchgezogene Linie wurde mit Hilfe von Gleichung 9 berechnet. (B) Die Fluoreszenzänderung nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts ΔF_{eq} wurde gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und mit Gleichung 12 approximiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Für die von der Konzentration unabhängigen Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{diss} wurde ein Wert von $2,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{app} zeigte dagegen eine hyperbole Abhängigkeit von der Peptidkonzentration. Da für einen einfachen Einschrittbindungsprozeß (Schema 1, Gleichung 7) eine lineare Beziehung zwischen k_{app} und der Konzentration des Liganden zu erwarten ist, deutet das Sättigungsverhalten auf einen komplexeren Prozeß hin (Hiromi, 1979).



Schema 1

$$k_{\text{app}} = k_{\text{hin}}[L] + k_{\text{rück}}$$

Gleichung 7

k_{hin} Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
 $k_{\text{rück}}$ Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion

Für einen Zweischnittbindungsprozeß, der sich aus einem schnellen bimolekularen Bindungs- und einem langsameren unimolekularen Isomerisierungsschritt zusammensetzt (Schema 2) gelten Gleichungen 8 und 9 (Hiromi, 1979).



Schema 2

$$k_{\text{app1}} = k_{+1}[L] + k_{-1}$$

Gleichung 8

k_{app1} apparente Geschwindigkeitskonstante des ersten Schritts
 k_{+1} Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion des ersten Schritts
 k_{-1} Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion des ersten Schritts

$$k_{\text{app2}} = \frac{k_{+2}[L]}{K_{-1} + [L]} + k_{-2}$$

Gleichung 9

k_{app2} apparente Geschwindigkeitskonstante des zweiten Schritts
 k_{+2} Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion des zweiten Schritts
 k_{-2} Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion des zweiten Schritts
 K_{-1} Dissoziationskonstante des ersten Schritts

Wie in Abbildung 12A gezeigt, konnten die beobachteten apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation sehr präzise mit dem Verhalten des zweiten Schritts dieses Zweischnittmodells (Gleichung 9) beschrieben werden. Aus dem streng monoexponentiellen Verlauf der Fluoreszenzänderung ergab sich zusätzlich, daß ausschließlich der zweite Schritt, der Isomerisierungsprozeß, nicht aber die Peptidbindung für die Löschung des Fluoreszenzsignals verantwortlich ist. Demnach läßt sich die Assoziation

des Peptid-TAP-Komplexes in einen schnellen Peptidbindungsschritt und eine langsamere Konformationsänderung untergliedern (Schema 2). Die Gleichgewichtskonstanten für den zweiten Schritt K_{+2} und die Dissoziationskonstante für den Gesamtprozeß K_{ges} wurden mit Gleichungen 10 und 11 berechnet (Hiromi, 1979) und mit den anderen ermittelten Konstanten in Tabelle 1 zusammengefaßt.

$$K_{+2} = \frac{k_{+2}}{k_{-2}}, \quad K_{\text{ges}} = \frac{K_{-1}}{1 + K_{+2}} \quad \text{Gleichung 10, 11}$$

K_{+2} Gleichgewichtskonstante für den zweiten Schritt
 K_{ges} Dissoziationskonstante für den gesamten Prozeß

Geschwindigkeitskonstanten [$\text{s}^{-1} \times 10^3$]	Gleichgewichtskonstanten
$k_{+2} = 7,4 \pm 0,9$	$K_{-1} = 32,0 \pm 3,0 \text{ nM}$
$k_{-2} = 2,9 \pm 0,4$	$K_{+2} = 2,6 \pm 0,2$
$k_{\text{diss}} = 2,1 \pm 0,8$	$K_{\text{ges}1} = 9,1 \pm 1,6 \text{ nM}$
	$K_{\text{ges}2} = 12,0 \pm 1,0 \text{ nM}$

**Tab. 1 Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten
der Peptid-TAP-Wechselwirkung**

Die Parameter k_{+2} , k_{-2} und K_{-1} wurden mit Hilfe von Gleichung 9 berechnet. Die Dissoziationskonstante k_{diss} entspricht dem Mittelwert der Dissoziationskonstanten, die in Abbildung 12A gezeigt sind. Die Gleichgewichtskonstanten K_{+2} und $K_{\text{ges}1}$ wurden mit Gleichung 10 bzw. 11 ermittelt. $K_{\text{ges}2}$ wurde durch Approximation der Daten aus Abbildung 12B mit Gleichung 12 bestimmt.

Gestützt wird dieses Zweischnittmodell zusätzlich durch die experimentell bestimmte Dissoziationskonstante $k_{\text{diss}} = 2,1 \pm 0,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, die sehr gut mit dem berechneten Wert für $k_{-2} = 2,9 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Gleichung 9) übereinstimmt (Tab. 1).

Als weitere Absicherung für das vorgeschlagene Modell, wurde die Dissoziationskonstante für den gesamten Prozeß K_{ges} mit einer unabhängigen Methode bestimmt. Dazu wurde die Fluoreszenzänderung nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts ΔF_{eq} in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration bestimmt und mit Gleichung 12 approximiert (Abb. 12B).

$$\Delta F_{\text{eq}} = \frac{\Delta F_{\text{eq}, \text{max}} [\text{L}]}{K_{\text{ges}} + [\text{L}]} \quad \text{Gleichung 12}$$

$\Delta F_{\text{eq}, \text{max}}$ maximale Fluoreszenzänderung bei hohen Peptidkonzentrationen

Die so erhaltene Gleichgewichtskonstante $K_{\text{ges}} = 12,0 \pm 1,0 \text{ nM}$ stimmte im Rahmen des Fehlers mit dem Wert überein, der mit Hilfe der kinetischen Analyse ermittelt worden war ($9,1 \pm 1,6 \text{ nM}$) (Tab. 1).

1.4 Assoziation und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes sind durch eine hohe Aktivierungsenergie gekennzeichnet

Da die Aktivierungsenergie einen charakteristischen Parameter für chemische und physikalische Abläufe darstellt, wurde eine Arrhenius-Analyse für die Assoziation und die Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes durchgeführt. Dafür wurde die Wechselwirkung des Peptids RRYΦKSTEL mit TAP-haltigen Mikrosomen zwischen 6 und 26°C fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Oberhalb von 26°C wurden wegen der geringen Stabilität von TAP keine Messungen durchgeführt (van Endert, 1999). Bei allen Experimenten wurde in Abwesenheit von ATP gearbeitet, um sicherzustellen, daß ausschließlich die Assoziation und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes und nicht Peptidtransport beobachtet werden.

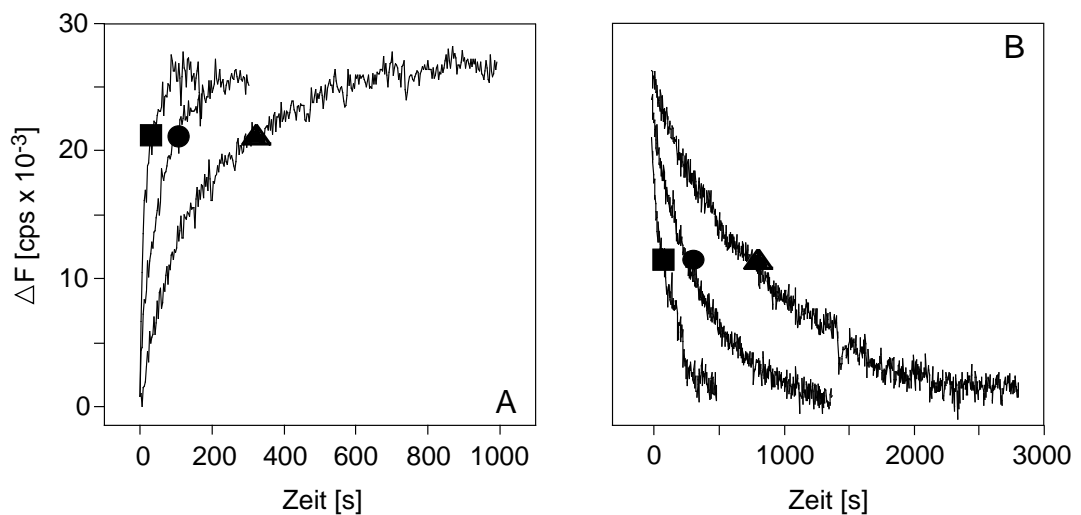


Abb. 13 Temperaturabhängigkeit der Peptid-TAP-Assoziation und Dissoziation

(A) Die Kinetik der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes wurde durch Inkubation TAP-haltiger Mikrosomen mit 40 nM RRYΦKSTEL in Abwesenheit von ATP fluoreszenzspektroskopisch bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht ($\lambda_{\text{em/ex}} = 470/515 \text{ nm}$). Die TAP-Konzentration betrug 4 nM. (B) Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts wurde durch Zugabe eines 400-fachen Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid die Peptid-TAP-Dissoziation beobachtet. Exemplarisch wurden hier nur die zeitabhängigen Fluoreszenzänderungen ΔF bei 6 (▲), 14 (●) und 22°C (■) dargestellt.

Wie exemplarisch für 6, 14 und 26°C gezeigt, nahm sowohl die Assoziations- (Abb. 13A) als auch die Dissoziationsgeschwindigkeit (Abb. 13B) bei steigenden Temperaturen deutlich zu. Die Fluoreszenzänderung nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts ΔF_{eq} ist dagegen temperaturunabhängig. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, daß im untersuchten Temperaturbereich die Zahl der Bindungsplätze konstant bleibt.

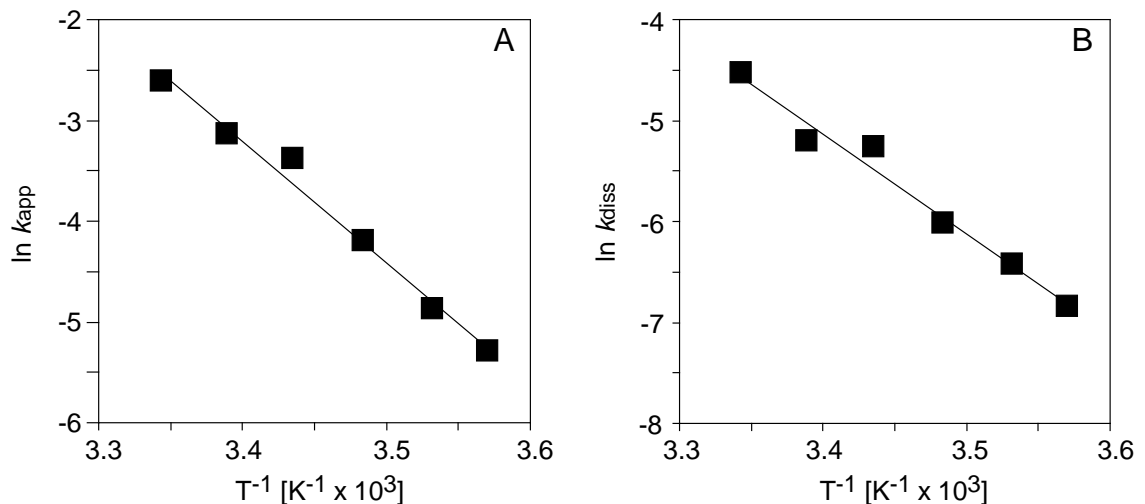


Abb. 14 Arrhenius-Analyse

Gemäß Gleichung 13 wurde die apparente Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{app} (A) und die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{diss} (B) gegen die Temperatur aufgetragen. Aus den Steigungen ergab sich für die Assoziation bzw. die Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes eine Aktivierungsenergie von $E_a^{ass} = 99,9 \pm 5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $E_a^{diss} = 82,1 \pm 6,6 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Die Geschwindigkeitskonstanten k wurden durch Approximation der Fluoreszenzverläufe mit den monoexponentialen Gleichungen 5 bzw. 6 bestimmt und gemäß Gleichung 13 in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen (Abb. 14).

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Gleichung 13}$$

A	präexponentieller Faktor
E_a	Aktivierungsenergie
R	allgemeine Gaskonstante
T	Temperatur

Wie in Abbildung 14 gezeigt, wurden im ausgewählten Temperaturbereich lineare Arrhenius-Beziehung beobachtet. Aus den Steigungen ergaben sich für die Peptid-TAP-Assoziation und Dissoziation Aktivierungsenergien von $E_a^{ass} = 99,9 \pm 5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $E_a^{diss} = 82,1 \pm 6,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Der Vergleich der gemessenen Aktivierungsenergien mit Literaturwerten macht deutlich, daß bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes ein ener-

getisch außerordentlich ungünstiger Übergangszustand überwunden werden muß. So beträgt die Aktivierungsenergie für die Bindung des Modellliganden GR-flu an den Serotonin-5HT₃-Rezeptor nur 50 kJ mol⁻¹ (Tairi *et al.*, 1998). Für die Öffnung des CFTR-Chloridkanals wurde eine Aktivierungsenergie von 104 kJ mol⁻¹ bestimmt, während für die Schließung des Kanals nur 10 kJ mol⁻¹ benötigt werden (Aleksandrov & Riordan, 1998).

1.5 Drastische Wärmekapazitätzunahme während der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes

Nachdem die Kinetik der Peptid-TAP-Assoziation analysiert worden war, wurde die Frage adressiert, welche Wechselwirkungskräfte für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes verantwortlich sind. Für alle spontan ablaufenden Reaktionen ist die Abnahme der freien Energie G° ($\Delta G^\circ < 0$) Voraussetzung. Da sich die Änderung der freien Energie ΔG° nach der Gibbs-Helmholz-Gleichung (Gleichung 14) aus der Änderung der Enthalpie ΔH° und der Entropie ΔS° zusammensetzt, können mit Hilfe der Temperaturabhängigkeit von ΔG° die Beiträge der einzelnen thermodynamischen Terme analysiert werden. Statt der experimentell schwieriger zugänglichen Änderung der freien Energie ΔG° , wurde die Dissoziationskonstante des Peptid-TAP-Komplexes K_{ges} bei verschiedenen Temperaturen ermittelt und die Änderung der freien Energie ΔG° für den Assoziationsprozeß berechnet (Gleichung 15).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Gleichung 14}$$

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_{\text{ges}} \quad \text{Gleichung 15}$$

ΔG°	Änderung der freien Energie für Peptid-TAP-Assoziation
ΔH°	Enthalpieänderung für Peptid-TAP-Assoziation
ΔS°	Entropieänderung für Peptid-TAP-Assoziation

Dazu wurden bei unterschiedlichen Temperaturen TAP-haltige Mikrosomen mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids RRYΦKSTEL in einer Fluoreszenzküvette gemischt und die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet. Alle Experimente wurden in Abwesenheit von ATP durchgeführt, um Peptidtransport zu verhindern. Exemplarisch ist in Abbildung 15A die zeitabhängige Änderung des Emissionssignals ΔF bei 292 K gezeigt.

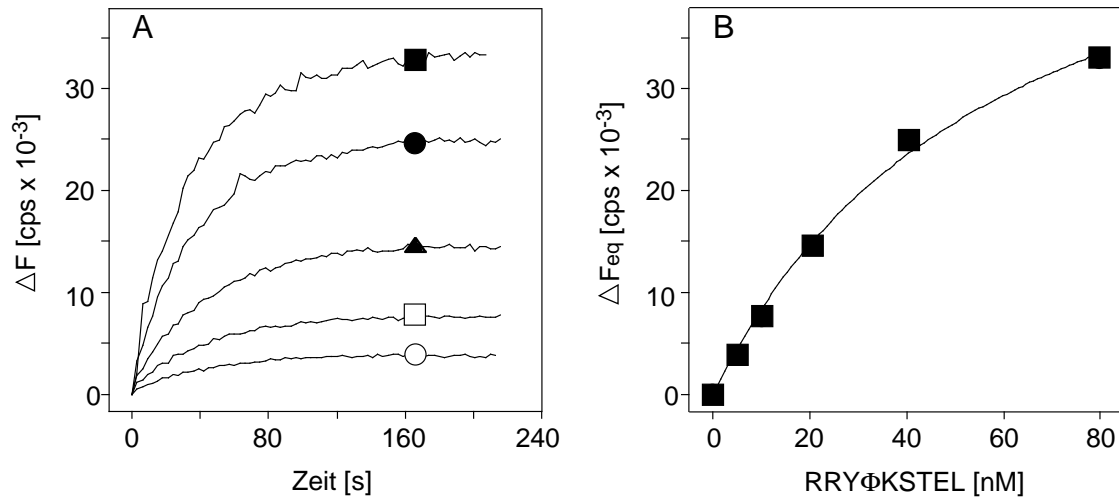


Abb. 15 Temperaturabhängigkeit der Affinität von Peptiden für den TAP-Komplex
 (A) TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 5,0 (○), 10 (□), 20 (▲), 40 (●) und 80 nM (■) des Peptids RRY Φ KSTEL bei 292 K gemischt und die Fluoreszenzänderung ($\Delta F = F(t=0) - F(t)$) gegen die Zeit aufgetragen ($\lambda_{\text{em/ex}} = 470/515 \text{ nm}$). Die TAP-Konzentration betrug 5 nM. (B) Die Fluoreszenzänderungen nach Einstellung des Assoziationsgleichgewichts ΔF_{eq} wurden gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und mit Gleichung 12 approximiert. Hier wurde eine Gleichgewichtskonstante für den Dissoziationsprozeß $K_{\text{ges}} = 56,0 \pm 15,2 \text{ nM}$ ermittelt.

Die Fluoreszenzänderung nach Einstellung des Gleichgewichts ΔF_{eq} wurde gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und mit Gleichung 12 approximiert (Abb. 15B). Die für verschiedene Temperaturen erhaltenen Gleichgewichtskonstanten K_{ges} wurden in die Änderungen der freien Energien ΔG° bei der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes umgerechnet (Gleichung 15) und in Tabelle 2 zusammengefaßt.

T [K]	K_{ges} [nM]	G° [kJ mol ⁻¹]
283	$19,6 \pm 8,6$	$-41,7 \pm 1,0$
287	$32,1 \pm 9,3$	$-41,2 \pm 0,7$
289	$58,0 \pm 7,4$	$-40,0 \pm 0,3$
292	$56,0 \pm 15,2$	$-40,5 \pm 0,7$
294	$51,4 \pm 6,0$	$-41,0 \pm 0,3$
296	$26,4 \pm 8,9$	$-42,9 \pm 0,8$
299	$20,3 \pm 7,2$	$-44,0 \pm 0,9$

Tab. 2 Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K_{ges} und der Änderung der freien Energie ΔG°

Überraschenderweise wurde keine lineare Abhängigkeit der Änderung der freien Energie ΔG° von der Temperatur festgestellt (Abb. 16) wie die Gibbs-Helmholz-Gleichung zunächst impliziert (Gleichung 14). Stattdessen wurde ein Minimum der treibenden Kraft für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes bzw. ein Maximum für die Gleichgewichtskonstante K_{ges} bei 289 K beobachtet. Während bei 289 K die Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation K_{ges} $58,0 \pm 7,4$ nM betrug, wurden für die niedrigste und höchste untersuchte Temperatur Werte von $19,6 \pm 8,6$ (283 K) bzw. $20,3 \pm 7,2$ nM (299 K) gefunden (Tab. 2).

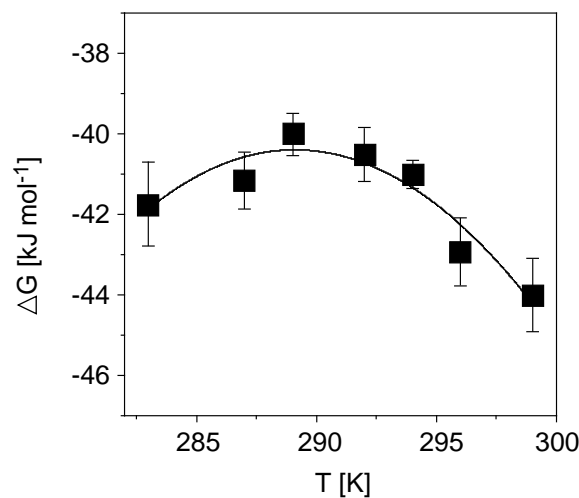


Abb. 16 Temperaturabhängigkeit von ΔG° bei der Peptid-TAP-Assoziation

Die temperaturabhängigen Werte für ΔG° bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes wurden gegen die Temperatur aufgetragen und mit Gleichung 16 approximiert. Es wurde eine Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p^\circ = 22,8 \pm 4,7$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ bestimmt. Zusätzlich wurde eine Änderung der Enthalpie von $\Delta H^\circ = 185,0 \pm 40,0$ kJ mol⁻¹ und der Entropie von $0,8 \pm 0,1$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ bei $T_0 = 299$ K berechnet.

Im Gegensatz zur gewöhnlichen Gibbs-Helmholz-Gleichung (Gleichung 14), berücksichtigt die erweiterte Gibbs-Helmholz-Gleichung (Gleichung 16) eine potentielle Wärmekapazitätsänderung ΔC_p° während des untersuchten Prozesses und temperaturabhängige Änderungen der Enthalpie ΔH° und Entropie ΔS° (Gleichung 16) (Boniface *et al.*, 1999).

$$\Delta G^\circ = \Delta H_{T_0}^\circ + \Delta C_p^\circ (T - T_0) - T \Delta S_{T_0}^\circ - T \Delta C_p^\circ \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \quad \text{Gleichung 16}$$

T_0 beliebig gewählte Standardtemperatur
 $\Delta H_{T_0}^\circ$ Änderung der Enthalpie bei T_0
 $\Delta S_{T_0}^\circ$ Änderung der Entropie bei T_0
 ΔC_p° Änderung der Wärmekapazität

Wie in Abbildung 16 gezeigt, ließen sich die experimentellen ΔG° -Werte sehr gut mit der erweiterten Gibbs-Helmholz-Gleichung beschreiben (Gleichung 16). Die Anwendung der Gleichung ergab, daß sich die Wärmekapazität ΔC_p° während der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes dramatisch erhöht ($\Delta C_p^\circ = 22,8 \pm 4,7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Da die Approximation der Daten mit Gleichung 16 die Wahl einer beliebigen Standardtemperatur T_0 verlangt, wurden zusätzlich die Enthalpie- bzw. Entropieänderung $\Delta H^\circ = 185,0 \pm 39,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\circ = 0,8 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei $T_0 = 299 \text{ K}$ bestimmt.

1.6 Temperaturabhängigkeit der Enthalpie- und Entropieänderung bei der Peptid-TAP-Assoziation

Aus der Temperaturabhängigkeit der freien Energie ΔG° folgt, daß die Änderungen der Enthalpie ΔH° und der Entropie ΔS° ebenfalls temperaturabhängig sind. ΔH° und ΔS° wurden bei verschiedenen Temperaturen berechnet (Gleichung 17 und 18) und in Abbildung 17 dargestellt (Boniface *et al.*, 1999).

$$\Delta H^\circ = \Delta H_{T_0}^\circ + \Delta C_p^\circ (T - T_0) \quad \text{Gleichung 17}$$

$$\Delta S^\circ = \Delta S_{T_0}^\circ + \Delta C_p^\circ \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \quad \text{Gleichung 18}$$

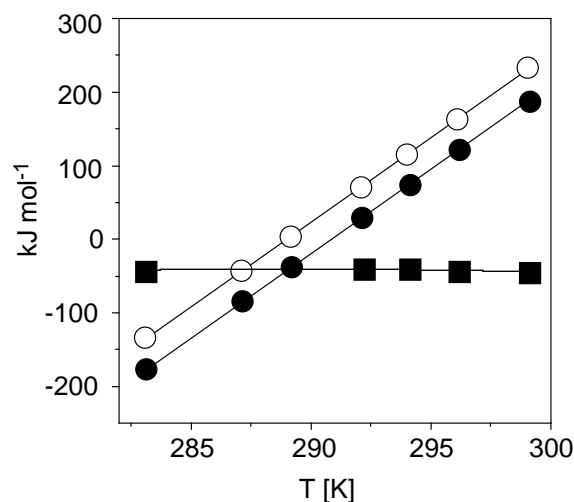


Abb. 17 Temperaturabhängigkeit von ΔH° und ΔS° bei der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes

Die temperaturabhängigen Werte für ΔH° und ΔS° wurden mit Gleichungen 17 und 18 berechnet und ΔH° (●), $T\Delta S^\circ$ (○) und ΔG° (■) gegen die Temperatur aufgetragen.

Unterhalb von 289 K stellt die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes eine exotherme Reaktion dar, bei der die Entropie abnimmt. Oberhalb 291 K ist der Assoziationsprozeß endotherm und die Entropie nimmt zu. Zwischen 289 und 291 K wird die Reaktion sowohl durch eine Abnahme der Enthalpie als auch durch eine Zunahme der Entropie getrieben. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß unterhalb 289 K der ΔH° - den ΔS° -Wert kompensiert, während bei physiologischen Temperaturen der Assoziationsprozeß ausschließlich durch die Entropiezunahme gesteuert wird.

1.7 Interpretation der Wärmekapazitätszunahme bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes

Um Wärmekapazitätsänderungen ΔC_p° im Zusammenhang mit Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen bzw. Proteinfaltungsprozessen interpretieren zu können, wurden intensive theoretische und empirische Studien durchgeführt (Sturtevant *et al.*, 1977; Spolar *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1990; Spolar *et al.*, 1992; Pivalov *et al.*, 1992; Spolar & Record, 1994). Diese Arbeiten zeigten, daß die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p° hauptsächlich auf eine Veränderung der Polarität der wasserzugänglichen Proteinoberfläche zurückzuführen ist (Gleichung 19).

$$\Delta C_p^\circ = 0,32 \Delta A_{ap} - 0,14 \Delta A_p \quad \text{Gleichung 19}$$

ΔA_{ap} Änderung der apolaren wasserzugänglichen Proteinoberfläche

ΔA_p Änderung der polaren wasserzugänglichen Proteinoberfläche

Für den TAP-Komplex bedeutet dies, daß die peptidinduzierte TAP-Struktur eine erhöhte Hydrophobizität der wasserexponierten Regionen aufweist. Ob bei der Konformationsänderung hydrophobe Aminosäurereste, die zuvor im Inneren des Proteins lokalisiert waren bzw. durch die Membran abgeschirmt wurden, an die Oberfläche gelangen oder ob hydrophile Reste sich ins Proteininnere bewegen, kann nicht entschieden werden. Der Vergleich verschiedener Wärmekapazitätsänderungen im Zusammenhang mit Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zeigt, daß sich die Polarität der TAP-Oberfläche dramatisch verändert. So wurde für die Glukosebindung an Hefe-Hexokinase nur ein ΔC_p° -Wert von $-0,2 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Takahasi *et al.*, 1981) festgestellt. Die Bindung des S-Peptids an das S-Protein aus dem Ribonuklease S-System führt zu einer Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p^\circ = -1,8 \pm 1,1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Varadarajan *et al.*, 1992) und für die Dimerisierung des Lambda-Phagen-kodierten λ cro Repressors wurde ein Wert von $\Delta C_p^\circ = -6,4 \pm 0,7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ gefunden (Griko *et al.*, 1992). Lediglich die

Konformationsänderung von Pepsinogen führt zu einer Wärmekapazitätsänderung ($\Delta C_p^\circ = -25,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (Spolar & Record, 1994), die mit der des TAP-Komplexes vergleichbar ist. Es ist auffällig, daß im Gegensatz zur Peptid-TAP-Assoziation für die überwiegende Mehrheit der untersuchten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen eine negative Wärmekapazitätsänderung in der Literatur beschrieben ist. Neben der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes sind nur wenige weitere Beispiele für positive Wärmekapazitätsänderungen bekannt wie z.B. die Kalziumbindung an eine der beiden Bindungsstellen des Troponins C (Yamada, 1999) oder die Bindung des antibakteriellen Magainin Peptids an ungeladene Membranen (Wieprecht *et al.*, 1999).

Während eine Wärmekapazitätsänderung dokumentiert, daß sich die Polarität der Proteinoberfläche verändert, enthält sie keine Information, in welchem Ausmaß sich die Proteinstruktur umorganisiert. Hält sich z.B. die Zahl der umorientierten hydrophoben und hydrophilen Aminosäurereste die Waage, so wird trotz einer dramatische Umstrukturierung des Proteins keine Veränderung der Wärmekapazität beobachtet. Auf der anderen Seite kann auch für eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, die keine Konformationsänderung induziert, eine Wärmekapazitätsänderung beobachtet werden. Dies ist z.B. der Fall, wenn durch die Ligandbindung polare bzw. apolare Bereiche des Liganden oder des Proteins abgeschirmt werden. Um etwas mehr über die Konformationsänderung des TAP-Komplexes zu erfahren, wurde der entropieanalytische Ansatz von Spolar & Record (1994) verfolgt. Demnach setzt sich die Gesamtentropieänderung ΔS° einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung aus teilweise gegenläufigen Summanden zusammen (Gleichung 20).

$$\Delta S^\circ = \Delta S_{\text{HE}}^\circ + \Delta S_{\text{rt}}^\circ + \Delta S_{\text{Konf}}^\circ \quad \text{Gleichung 20}$$

$\Delta S_{\text{HE}}^\circ$ Entropieänderung durch hydrophobe Effekte

$\Delta S_{\text{rt}}^\circ$ Entropieänderung durch eingeschränkte Translation und Rotation

$\Delta S_{\text{Konf}}^\circ$ Entropieänderung durch Konformationswechsel

$\Delta S_{\text{HE}}^\circ$ entspricht der Entropieänderung, die durch hydrophobe Effekte hervorgerufen wird. Dies wird z.B. bei der Bewegung von apolaren Regionen aus dem Inneren eines Proteins an dessen wasserzugängliche Oberfläche beobachtet. $\Delta S_{\text{rt}}^\circ$ steht für den Anteil der Entropieänderung, der durch die eingeschränkten Translations- und Rotationsmöglichkeiten nach Ligandbindung verursacht wird. $\Delta S_{\text{Konf}}^\circ$ beschreibt alle übrigen Effekte im Zusammenhang mit der Konformationsänderung. Der Anteil der einzelnen Terme an der Gesamtentropieänderung ΔS° wurde mit Hilfe der sogenannten Temperatur T_s analysiert, bei der keine Entropieänderung ΔS° ($\Delta S^\circ=0$) beobachtet wird. Im Falle der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes liegt T_s bei 289 K (Abb. 17). $\Delta S_{\text{HE}}^\circ$ ist temperaturabhängig und kann mit der semiempirischen Gleichung 21 berechnet werden

(Spolar & Record, 1994). Bei 289 K ergibt sich für die Peptid-TAP-Wechselwirkung ein Wert von $\Delta S^{\circ}_{\text{HE}} = -8,6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

$$\Delta S^{\circ}_{\text{HE}} = 1,35 \Delta C_p^{\circ} \ln\left(\frac{T}{386}\right) \quad \text{Gleichung 21}$$

Da $\Delta S^{\circ}_{\text{rt}}$ von dem Logarithmus der Temperatur und der Molekülmasse abhängt, ist die Entropieänderung $\Delta S^{\circ}_{\text{rt}}$ relativ konstant im gesamten Bereich biologisch relevanter Temperaturen und Massen (Janin & Chlothia, 1978; Finkelstein & Janin, 1989). Aus dem Vergleich zahlreicher Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen erhielten Spolar und Record (1994) einen Wert von $\Delta S^{\circ}_{\text{rt}} = -0,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, der auch für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes angenommen werden kann. Mit dem Wissen von $\Delta S^{\circ}_{\text{HE}}$ und $\Delta S^{\circ}_{\text{rt}}$ kann der Term $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ bei der Temperatur $T_s = 289 \text{ K}$ mit Hilfe der Gleichung 20 berechnet werden. So ergibt sich für Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes bei 289 K ein positiver Term von $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}} = 8,8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Da $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ wie $\Delta S^{\circ}_{\text{rt}}$ relativ temperaturunabhängig ist, kann angenommen werden, daß dieser Wert im gesamten physiologischen Temperaturbereich gültig ist (Spolar & Record, 1994).

Weil $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ mit dem Ausmaß der Konformationsänderung korreliert, werden für die Wechselwirkungen zwischen starren Körpern lediglich kleine $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ -Werte erwartet. So wurde für die Bindung des Subtilisininhibitors an das Subtilisinmonomer $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}} = -0,04 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt (Spolar & Record, 1994). Der deutlich größere $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ -Wert für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes deutet dagegen auf eine drastische Umorganisation der TAP-Struktur hin.

Unter der Annahme, daß $\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}$ hauptsächlich auf einer Konformationsänderung beruht, läßt sich das Ausmaß der Umstrukturierung abschätzen. So entwickelten und validierten Spolar & Record (1994) durch die Analyse zahlreicher NMR- und Röntgenstrukturdaten Gleichung 22 mit deren Hilfe die Anzahl der Aminosäuren berechnet werden kann, die an einer Konformationsänderung beteiligt sind.

$$R = \frac{\Delta S^{\circ}_{\text{Konf}}}{23 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}} \quad \text{Gleichung 22}$$

R Anzahl der an einem Konformationswechsel beteiligten Aminosäuren

Während nur sechs bis neun Aminosäuren bei der Bindung von Biotin an Avidin umorientiert werden (Livnah *et al.*, 1993), bewegen sich 36 Aminosäuren bei der Wechselwirkung des MHC-Klasse-II-Moleküls E^k mit dem T-Zell-Rezeptor 2B4 (Boniface *et al.*, 1999). In der Hirudin-induzierten Faltung von Thrombin sind 50 bis 100

(Ayala *et al.*, 1995) und bei der Dimerisierung des λ cro Repressors 102 bis 120 Aminosäuren beteiligt (Griko *et al.*, 1992). Für die peptidinduzierte Konformationsänderung des TAP-Komplexes wurde berechnet, daß 383 der 1434 Aminosäuren (TAP1: 748 AS, TAP2: 686 AS) involviert sind. Das bedeutet, daß 27 % der TAP-Struktur nach der Peptidbindung neu organisiert wird. Diese hohe Zahl an Aminosäuren, die an dem Konformationswechsel beteiligt sind, belegt, daß tatsächlich der TAP-Komplex und nicht ausschließlich das gebundene Peptid seine Struktur ändert. Zusätzlich unterstreicht das gewaltige Ausmaß des strukturellen Umbaus die Bedeutung der peptidinduzierten TAP-Konformation und impliziert, daß es sich hierbei um einen essentiellen Schritt innerhalb des Transportzyklusses handelt.

1.8 In der Peptidbindungstasche des TAP-Komplexes sind Protonendonorguppen lokalisiert

Nachdem die Fluoreszenzlöschung von Fluoreszein-markierten Peptiden intensiv genutzt wurde, um die Kinetik und die Thermodynamik der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes zu untersuchen, wurde nach den molekularen Grundlagen für die Reduktion des Emissionssignals gefragt. Prinzipiell sind zwei Ursachen für die Fluoreszenzlöschung von Fluoreszein denkbar. So führt sowohl die Erhöhung der Hydrophobizität als auch die Erniedrigung des pH-Werts in der Mikroumgebung des Fluoreszeinmoleküls zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals (Ohkuma & Poole, 1978). Um zu verstehen, welcher Mechanismus der Fluoreszenzlöschung bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes zu Grunde liegt, wurden die Emissionsspektren von TAP-gebundenem und ungebundenem RRY Φ KSTEL mit den Spektren von RRY Φ KSTEL in Puffern mit fallendem pH-Wert oder steigender Hydrophobizität verglichen. Wie in Abbildung 18 gezeigt, verschiebt sich das Emissionsmaximum in Puffern mit steigender Hydrophobizität zu höheren Wellenlängen, während sich das Maximum des Emissionssignals bei fallendem pH-Wert nicht verändert. Die zunehmende Hydrophobizität des Puffers wurde durch Zugabe von 1,4-Dioxan erreicht (Tairi *et al.*, 1998).

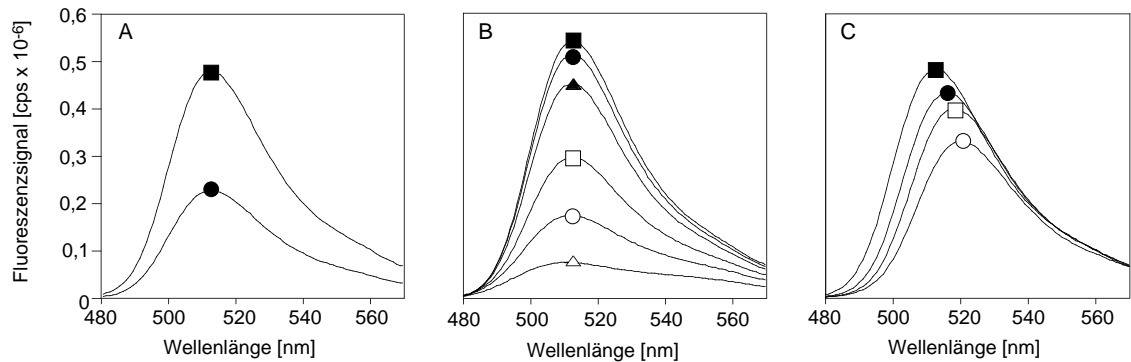


Abb. 18 Emissionsspektren von RRYΦKSTEL

(A) TAP-haltige Mikrosomen wurden in Bindungspuffer mit RRYΦKSTEL beladen, ungebundenes Peptid durch Waschen der Mikrosomen abgetrennt und das Emissionsspektrum von TAP-gebundenem RRYΦKSTEL bei 10°C aufgenommen ($\lambda_{\text{ex}} = 470$) (●). Anschließend wurde RRYΦKSTEL durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid verdrängt und das Spektrum von ungebundenem RRYΦKSTEL aufgezeichnet (■). (B) Die Emissionsspektren von RRYΦKSTEL wurden bei 10°C in Bindungspuffer mit abnehmenden pH-Werten von 9,0 (■), 8,0 (●), 7,0 (▲), 6,0 (□), 5,0 (○) und 4,0 (Δ) und (C) bei steigenden 1,4-Dioxan Konzentrationen von 0 (■), 20 (●), 40 (□) und 60 % (v/v) (○) aufgenommen.

Da sich für TAP-gebundenes bzw. ungebundenes RRYΦKSTEL keine Verschiebung des Emissionsmaximums beobachten läßt, ist davon auszugehen, daß sich nach der Konformationsänderung des TAP-Komplexes Protonendonorguppen in der unmittelbaren Nähe des Fluorophors befinden.

2. Essentielle Regionen und Struktur des viralen TAP-Inhibitors ICP47

Der durch MHC-Klasse-I-vermittelte Zweig des Immunsystems stellt eine effiziente Maschinerie zur Bekämpfung viraler Infektionen dar. Unter diesem evolutionären Druck entwickelten zahlreiche Viren Strategien, um der Immunüberwachung zu entgehen. So exprimiert der *Herpes Simplex Virus* (HSV) in der Frühphase seiner Proliferation den TAP-Inhibitor ICP47. Dieses Protein blockiert die Peptid-TAP-Assoziation und verhindert somit die Präsentation von Proteinfragmenten auf der Zelloberfläche. Im zweiten Teil der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die aktive Domäne des HSV-kodierten Proteins sowie essentielle Regionen innerhalb der aktiven Domäne identifiziert. Zusätzlich wurde die Struktur von ICP47 untersucht. Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle Experimente der humane TAP-Komplex und ICP47 aus HSV1 verwendet.

2.1 Kurze ICP47-Fragmente wechselwirken nicht mit dem TAP-Komplex

Um essentielle Regionen innerhalb der ICP47-Sequenz zu identifizieren, wurden mit Hilfe der Fmoc-Methode in einer Zusammenarbeit mit Prof. Jung (Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen) sechs überlappende, 25 Aminosäuren lange ICP47-Fragmente synthetisiert. Alle Fragmente zusammen deckten die gesamte 88 Aminosäuren umfassende Wildtyp-ICP47-Sequenz ab. Jedes dieser 25mere wurde in Konkurrenzexperimenten eingesetzt, um festzustellen, inwiefern sie in der Lage sind, die Peptidbindung an TAP zu blockieren. Dazu wurden TAP-haltige Mikrosomen mit radioaktiv markiertem Reporterpeptid und einem der ICP47-Fragmente inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosomen gewaschen und die Mikrosomen assoziierte Radioaktivität quantifiziert. Da der TAP-Komplex vorzugsweise Acht- bis 16mere bindet, war nicht davon auszugehen, daß die ICP47-Fragmente als Peptidsubstrat erkannt werden (van Endert *et al.*, 1994). Wie in Abbildung 19A gezeigt, blockierte keines der ICP47-Fragmente die Peptidbindung an den TAP-Komplex. Zusätzlich wurde die Aktivität verschiedener Kombinationen der 25mere analysiert. Obwohl die Fragmente 1-25, 27-51, 53-77 nahezu der kompletten ICP47-Sequenz entsprechen, blockierte auch keine der Kombinationen die Peptidbindung an den TAP-Komplex (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung, daß keines der ICP47-Fragmente in der Lage ist die Aktivität des unverkürzten Proteins nachzuahmen, deutet daraufhin, daß die Wechselwirkung zwischen ICP47 und dem TAP-Komplex auf mehreren Interaktionsstellen beruht. Um diese potentiellen Kontaktstellen zu identifizieren, wurde versucht, die Wechselwirkung zwischen dem TAP-Komplex und Wildtyp-ICP47 mit Hilfe der ICP47-Fragmente zu stören. Dazu wurden TAP-haltige Mikrosomen mit radioaktiv markiertem Reporterpeptid, einer

Wildtyp-ICP47-Konzentration, die die Peptidbindung zu 50 % inhibiert und einem Überschuß der verschiedenen 25mere inkubiert. Nachdem ungebundenes Reporterpeptid abgetrennt worden war, wurde die Menge des gebundenen Peptids gemessen. Keines der ICP47-Fragmente war in der Lage die Wildtyp-ICP47-Aktivität und somit die Wechselwirkung zwischen dem TAP-Komplex und Wildtyp-ICP47 zu unterbinden (Abb. 19B).

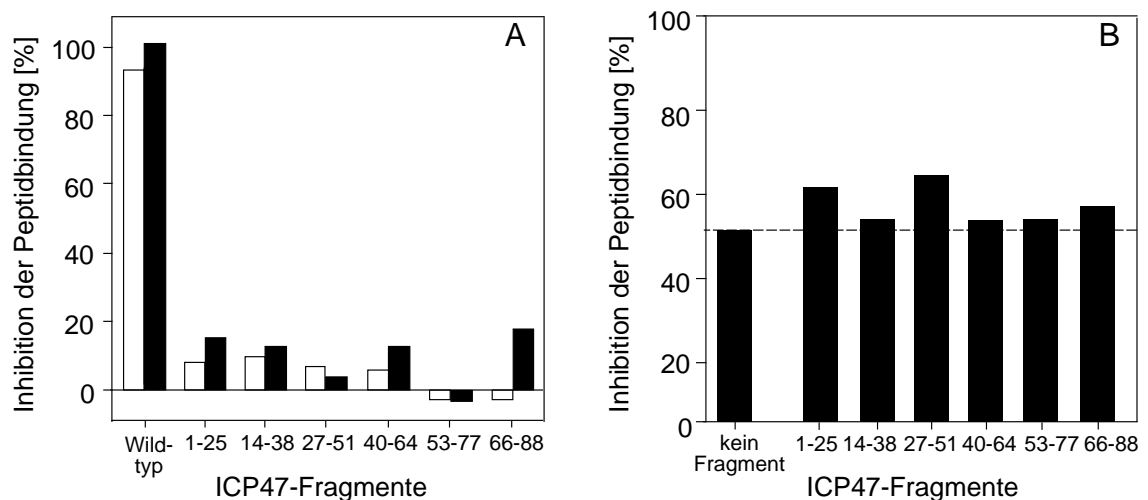


Abb. 19 Überlappende ICP47-Fragmente sind nicht aktiv

(A) In Konkurrenzexperimenten wurden TAP-haltige Mikrosomen mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL in Gegenwart eines zweifachen (offene Balken), bzw. 40-fachen Überschusses (geschlossene Balken) an ICP47-Fragmenten oder Wildtyp-ICP47 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Reporterpeptid durch Waschen der Mikrosomen entfernt, gebundenes Reporterpeptid quantifiziert und die Bindungsinhibition mit Hilfe von Gleichung 3 berechnet. (B) TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL, 5 μ M eines ICP47-Fragments und 50 nM Wildtyp-ICP47 inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt die Inhibition der Peptidbindung durch Wildtyp-ICP47 in Abwesenheit eines ICP47-Fragments an.

Da die ICP47-Fragmente weder allein noch in Kombination eine vergleichbare Aktivität mit dem Wildtyp-ICP47 zeigten und zusätzlich keines der 25mere die Wechselwirkung zwischen Wildtyp-ICP47 und dem TAP-Komplex störte, ist anzunehmen, daß die Integrität einer größeren Einheit für die Aktivität des viralen Inhibitors notwendig ist.

2.2 Wildtyp-ICP47 und die hochkonservierte N-terminale Region ICP47(1-53) zeigen die gleiche Aktivität

In einem zweiten Ansatz, essentielle Bereiche innerhalb des ICP47-Moleküls zu identifizieren, wurden die ICP47-Sequenzen aus verschiedenen HSV-Stämmen verglichen.

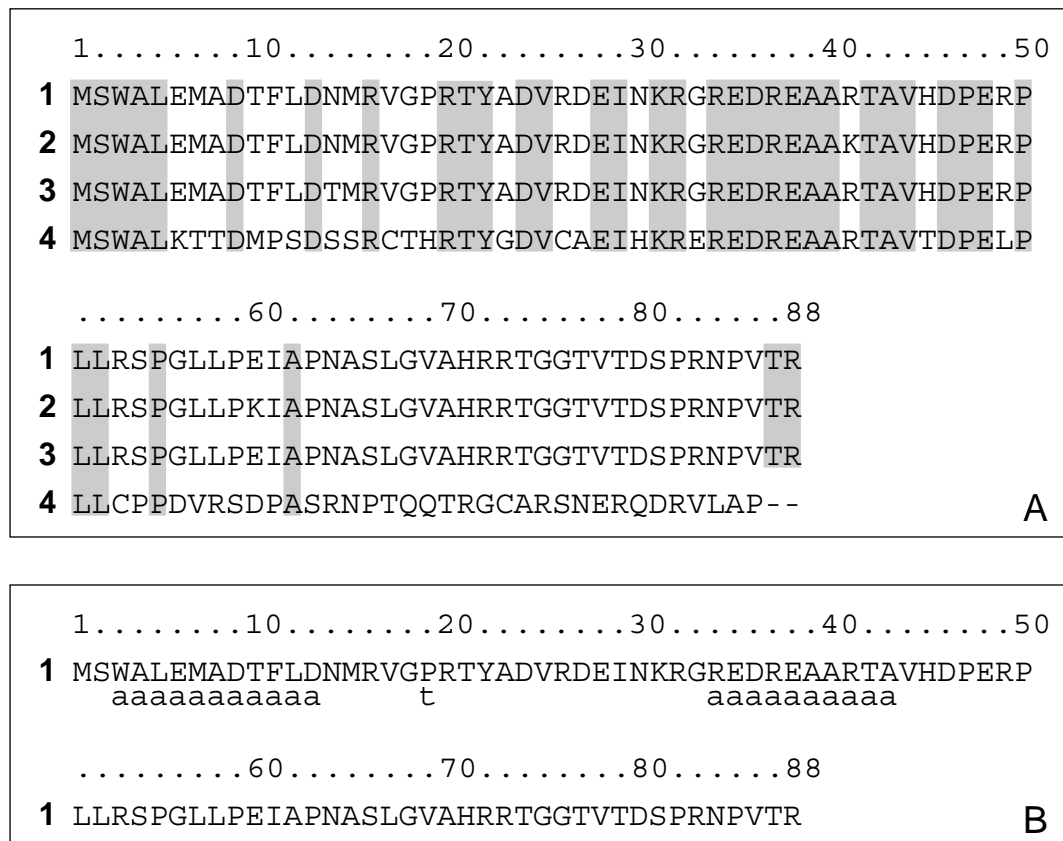


Abb. 20 Sequenzvergleich und Strukturvorhersage

(A) Mit dem Programm MACAW 2.0.4. wurden die ICP47-Sequenzen aus verschiedenen HSV-Stämmen verglichen. Sequenzidentische Abschnitte wurden grau unterlegt (1: McGeoch *et al.*, 1988; 2: Früh *et al.*, 1995; 3: McGeoch *et al.*, 1985; 4: Whitton & Clements, 1984; Kohlstätter *et al.*, 1996). (B) Basierend auf der Primärstruktur wurde mit Hilfe des Programms *McMatch* ein Helix-Turn-Helix Motiv vorhergesagt. α -helikale Regionen wurden mit einem "a" gekennzeichnet, während das Turn-Motiv mit "t" unterlegt ist.

Wie in Abbildung 20A gezeigt, sind die N-terminalen zwei Drittel der ICP47-Sequenz hochkonserviert. Zusätzlich wurde in diesem Bereich von dem Programm *McMatch*, ausgehend von der Primärstruktur, ein Helix-Turn-Helix Motiv vorhergesagt. Die C-terminale Hälfte schien dagegen keine charakteristischen Strukturmerkmale zu besitzen (Abb. 20B). Berechnungen mit Algorithmen der *Genetics Computer Group* (GCG) führten zu ähnlichen Ergebnissen. Sequenzähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen bestehen nicht. Basierend auf dem Sequenzvergleich und der Strukturvorhersage wurde angenommen, daß die N-terminale Region zwischen den Positionen 1 bis 53 für die Aktivität des viralen Inhibitors entscheidend ist. Um diese Hypothese zu überprüfen,

wurde die Aktivität von Wildtyp-ICP47 und des Fragments ICP47(1-53) verglichen. Dabei wurden alle vier bekannten Charakteristika von ICP47 untersucht; die Blockierung des TAP-vermittelten Peptidtransports, die Affinität zum TAP-Komplex, die Inhibition der Peptid-TAP-Bindung und die Speziespezifität für den humanen Antigenpeptid-Transporter.

Zuerst wurde mit Hilfe von Transportexperimenten überprüft, ob das hochkonservierte Segment ICP47(1-53) den ATP-abhängigen und TAP-vermittelten Peptidtransport blockiert. Dazu wurden TAP-haltige Mikrosomen mit Fluoreszein-markiertem Reporterpeptid und einer steigenden Konzentration ICP47(1-53) in Abwesenheit und Gegenwart von ATP inkubiert. Nachdem nicht transportierte Peptide durch Waschen der Mikrosomen abgetrennt worden waren, wurde die Menge transportierter Peptide fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert.

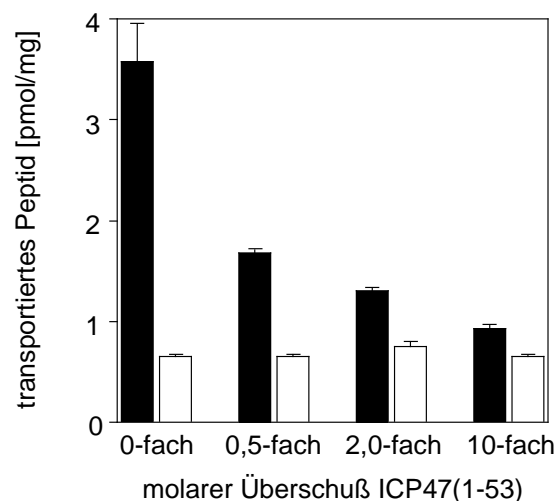


Abb. 21 Blockierung des Peptidtransports durch ICP47(1-53)

TAP-haltige Mikrosomen wurden im Bindungspuffer mit 300 nM Fluoreszein-markiertem Reporterpeptid RRYΦKSTEL und einer steigenden Konzentration ICP47(1-53) in Ab- (offene Balken) und Anwesenheit (geschlossene Balken) von 3 mM ATP 12 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transport durch Zugabe von eiskaltem Bindungspuffer gestoppt und TAP-gebundenes Reporterpeptid durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Kompetitorpeptid verdrängt. Nachdem die Mikrosomen durch mehrere Zentrifugationsschritte gewaschen worden waren, wurden sie lysiert und die Menge der transportierten Peptide fluoreszenzspektroskopisch bestimmt ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 21 dokumentiert, wurde eine deutliche Korrelation zwischen der Blockierung des ATP-abhängigen Peptidtransports und der ICP47(1-53)-Konzentration beobachtet. Der Vergleich der Inhibitionsaktivität des Fragments ICP47(1-53) mit der des Wildtyp-ICP47 (Ahn *et al.*, 1996) zeigte, daß beide Polypeptide den Peptidtransport mit gleicher Effizienz blockieren.

Anschließend wurde mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten untersucht, mit welcher Affinität ICP47(1-53) an den TAP-Komplex bindet. TAP-haltige Mikrosomen wurden mit einer steigenden Konzentration radioaktiv markiertem ICP47(1-53) inkubiert und die Menge des TAP-gebundenen ICP47(1-53) gegen die Konzentration aufgetragen. Die Hintergrundbindung wurde in Gegenwart eines hohen Überschusses an unmarkiertem ICP47(1-53) kontrolliert (Abb. 22).

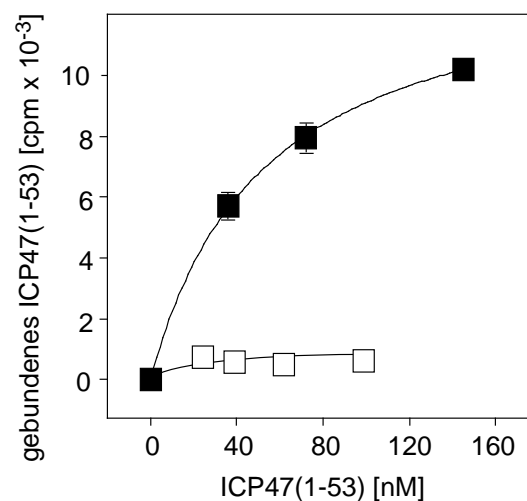


Abb. 22 Sättigungsbindungsexperiment

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit einer steigenden Konzentrationen ^{125}I -markiertem ICP47(1-53) in Ab- (■) und Anwesenheit (□) eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem ICP47(1-53) 45 min auf Eis inkubiert. Ungebundenes ICP47(1-53) wurde durch Waschen der Mikrosomen entfernt und Mikrosomen assoziiertes ICP47(1-53) mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert. Die Daten wurden mit Gleichung 2 approximiert. Für die Wechselwirkung zwischen ICP47(1-53) mit dem TAP-Komplex wurde ein $K_d = 53 \pm 5$ nM bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Es wurde ein sättigbares Bindungsverhalten beobachtet, das sich mit Gleichung 2 beschreiben ließ. Die berechnete Dissoziationskonstante $K_d = 53 \pm 5$ nM stimmte mit dem K_d -Wert (42 - 52 nM) für die Wechselwirkung zwischen Wildtyp-ICP47 und dem TAP-Komplex überein (Ahn *et al.*, 1996; Tomazin *et al.*, 1996). Somit ist gezeigt, daß das N-terminale Fragment ICP47(1-53) mit der gleichen Affinität an den TAP-Komplex bindet wie Wildtyp-ICP47.

Da die hohe Bindungsaffinität von ICP47(1-53) nicht notwendigerweise beweist, daß die konservierte N-terminale Region des viralen Inhibitors auch für die Blockierung der Peptidbindung verantwortlich ist, wurden Kompetitionsstudien durchgeführt. Dafür wurde die Inhibition der Peptidbindung in Gegenwart von steigender ICP47(1-53) bzw. Wildtyp-ICP47-Konzentration gemessen. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, blockiert das Fragment ICP47(1-53) die Peptidbindung mit vergleichbarer Effizienz wie Wildtyp-

ICP47. Die hier berechneten K_d -Werte von 60 ± 10 nM für ICP47(1-53) bzw. 50 ± 7 nM für Wildtyp-ICP47 sind im Rahmen des Fehlers identisch.

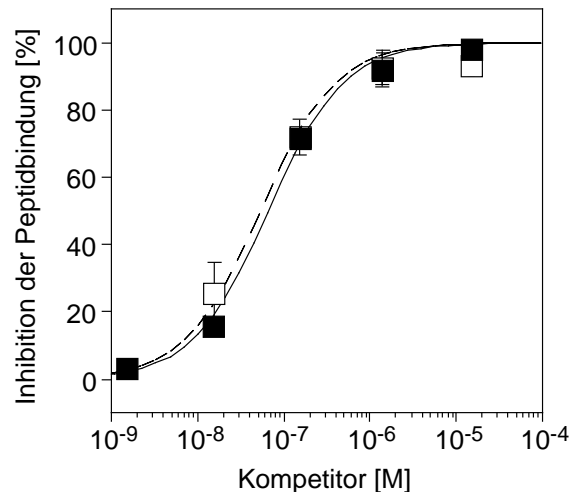


Abb. 23 Konkurrenzexperiment

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL und einer steigenden Menge ICP47(1-53) (■) bzw. Wildtyp-ICP47 (□) 45 min auf Eis inkubiert. Nachdem ungebundenes Reporterpeptid abgetrennt worden war, wurde die Mikrosomen assoziierte Radioaktivität gemessen und die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3). Die Mikrosomen assoziierte Radioaktivität, die 0 bzw. 100 % Inhibition der Peptidbindung entspricht, wurde in Abwesenheit oder Anwesenheit eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Peptid RRYQKSTEL bestimmt. Die Daten wurden mit Gleichung 4 approximiert und K_d -Werte von 60 ± 10 nM für ICP47(1-53) bzw. 50 ± 7 nM für Wildtyp-ICP47 berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Für Wildtyp-ICP47 wurde eine deutlich geringere Affinität zum murinen (mTAP) als zum humanen TAP-Komplex (hTAP) beobachtet (Ahn *et al.*, 1996). Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten wurde untersucht, ob das Fragment ICP47(1-53) eine vergleichbare Spezifität für den humanen Antigenpeptid-Transporter zeigt. Tatsächlich lag der IC_{50} -Wert von ICP47(1-53) beim mTAP-Komplex etwa 50-fach höher als beim humanen Transporter (Abb. 24). Aus den IC_{50} -Werten wurden für die Wechselwirkung zwischen ICP47(1-53) mit dem hTAP-Komplex ein $K_d = 50 \pm 13$ nM berechnet, während für die Bindung an den mTAP-Komplex eine Dissoziationskonstante $K_d = 2,7 \pm 0,8$ μ M gefunden wurde. Diese deutlich erhöhte Affinität des N-terminalen Segments ICP47(1-53) für den hTAP-Komplex zeigt, daß der konservierte N-terminale Bereich für die Spezifität verantwortlich ist.

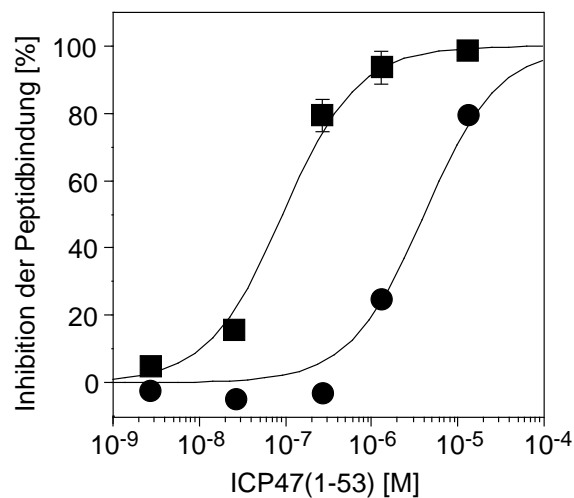


Abb. 24 Speziespezifität von ICP47(1-53)

hTAP- (■) bzw. mTAP-haltige (●) Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL und einer steigenden Konzentration ICP47(1-53) 45 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Menge gebundenen Peptids quantifiziert worden war, wurde die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3) und die Daten mit Gleichung 4 approximiert. Für die Bindung von ICP47(1-53) an den hTAP- bzw. mTAP-Komplex wurden Dissoziationskonstanten $K_d = 50 \pm 13$ nM und $K_d = 2,7 \pm 0,8$ μ M berechnet.

2.3 ICP47(3-34) entspricht der aktiven Domäne von ICP47

Wie die Untersuchungen des Fragments ICP47(1-53) ergeben haben, ist diese hochkonservierte N-terminale Region des viralen TAP-Inhibitors für alle vier bekannten Aktivitätsmerkmale verantwortlich. So wurden weder bei der Blockierung der Peptidbindung bzw. des Peptidtransports noch bei der Bindungsaffinität oder bei der Speziespezifität signifikante Unterschiede zwischen ICP47(1-53) und dem unverkürzten Polypeptid festgestellt. Anschließend wurde die Frage adressiert, inwiefern sich ICP47 ohne Aktivitätsverlust weiter verkürzen läßt. Um die minimale aktive Einheit von ICP47 zu identifizieren, wurden systematisch N- und C-terminal verkürzte ICP47-Fragmente in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Jung (Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen) synthetisiert und deren Aktivität mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten überprüft.

Während der Methionin- und der Serinrest an Position 1 und 2 für die Funktion von ICP47 nicht essentiell waren, führte der Verlust des Tryptophanrests an Position 3 zu einer signifikanten Aktivitätsabnahme (Abb. 25A). Fragmente, die kürzer als ICP47(4-53) waren, blockierten die Peptidbindung an den TAP-Komplex nicht mehr. Im Gegensatz zum N-Terminus konnte der C-Terminus überraschenderweise deutlich verkürzt werden (Abb. 25B). So blockierte noch das Fragment ICP47(1-34) die Peptidbindung mit der gleichen Effizienz wie das unverkürzte Polypeptid. Erst Fragmente kürzer als ICP47(1-34) verloren stufenweise ihre Aktivität. Für das Fragment ICP47(1-30) bzw. kürzere

Varianten konnte kein inhibitorischer Effekt mehr nachgewiesen werden. Die reduzierte Aktivität der Fragmente ICP47(1-46) und ICP47(1-48) deutete darauf hin, daß die zusätzliche negative Ladung durch den künstlich erzeugten freien C-Terminus an dieser Position nicht toleriert wird. Sowohl die Ergebnisse der N- als auch der C-terminalen Verkürzungen wurden durch die K_d-Wert-Bestimmung der einzelnen Fragmente bestätigt (Tab. 3).

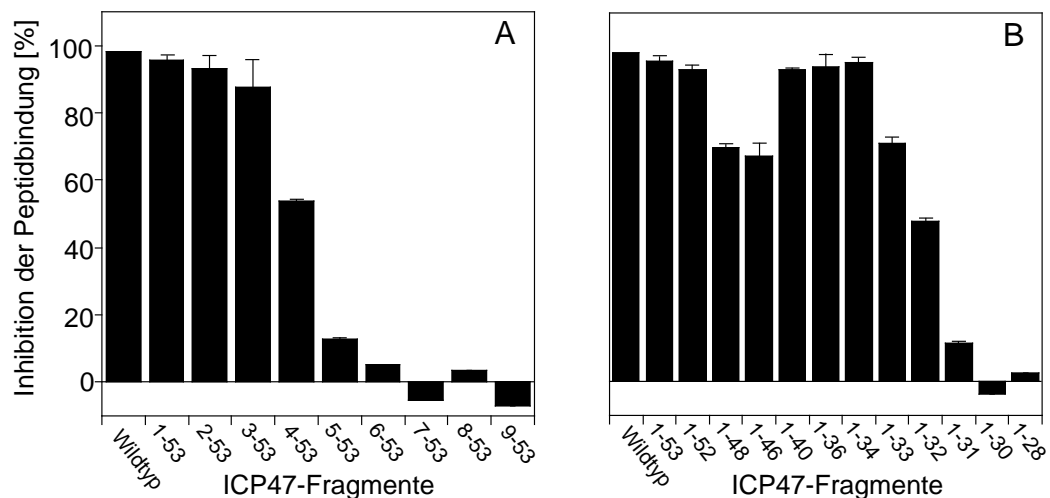


















Abb. 25 N- und C-terminale Verkürzungen von ICP47

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL in der Gegenwart von 1 µM der N- (A) bzw. C-terminal (B) verkürzten ICP47-Fragmente 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Quantifizierung des gebundenen Reporterpeptids wurde die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Resultate der N- und C-terminalen Verkürzungen implizierten, daß das Fragment ICP47(3-34) die minimale aktive Einheit des viralen Inhibitors darstellt. Um dies zu überprüfen, wurde das Fragment ICP47(3-34) synthetisiert und dessen Affinität zum TAP-Komplex bestimmt (Tab. 3). Unter Berücksichtigung des drastischen Affinitätsverlusts weiter verkürzter ICP47-Varianten stimmte die Dissoziationskonstante $K_d = 89 \pm 17$ nM von ICP47(3-34) mit der Affinitätskonstante von Wildtyp-ICP47 gut überein. Somit konnte ICP47(3-34) als die aktiven Domäne des viralen Inhibitors bezüglich der Blockierung der Peptidbindung an den TAP-Komplex identifiziert werden.

ICP47-Fragmente		K _d [nM]
ungekürzt 		42 ± 2
N-terminale Verkürzungen		
 1-53		50 ± 12
 3-53		67 ± 25
 4-53		155 ± 10
 5-53		> 1000
C-terminale Verkürzungen		
 1-53		50 ± 12
 1-48		126 ± 14
 1-46		133 ± 25
 1-40		45 ± 5
 1-36		66 ± 10
 1-34		66 ± 7
 1-33		103 ± 10
 1-32		332 ± 43
 1-31		696 ± 175
 1-30		> 1000
kürzestes aktive Fragment 		89 ± 17

Tab. 3 Affinität verkürzter ICP47-Moleküle zum TAP-Komplex

Für alle aufgelisteten ICP47-Varianten wurden die IC₅₀-Werte durch Konkurrenzexperimente bestimmt. Mit Hilfe eines internen Standards wurden die IC₅₀-Werte in K_d-Werte umgerechnet.

2.4 Ein Muster geladener Aminosäuren ist essentiell für die Aktivität von ICP47

Um essentielle Aminosäuren innerhalb der aktiven Domäne zu identifizieren, wurden zwei Arbeitshypothesen aufgestellt: Die erste Hypothese beruhte auf der Annahme, daß das vorhergesagten Helix-Turn-Helix-Motiv (Abb. 20B) für die Funktionalität von ICP47 entscheidend sein könnte. Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, daß bereits die teilweise Deletion der vorhergesagten N-terminalen α -Helix zum völligen Verlust der Aktivität führt (Abb. 25A). Das zweite Arbeitsmodell basierte auf einem konservierten Muster geladener Aminosäuren (Abb. 20A). Da der TAP-Komplex Peptide u.a. über ihre freien N- und C-Termini erkennt (Momburg *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 1994), wurde spekuliert, daß die Seitenketten der geladenen Aminosäuren den freien N- bzw. C-Terminus nachahmen.

	1.....10.....20.....30.....40.....
ICP47 (3-45)	..WALEMADTFLDNMRVGPRTYADVDEINKRGREDREAARTAVH
G18S/P19S	..WALEMADTFLDNMRV ^{SS} RTYADVDEINKRGREDREAARTAVH
HSpH	..WALEMADTFLD ^{GSGSGSGSGSGSGSGS} NKRGREDREAARTAVH

Abb. 26 Mutanten von ICP47

Ausgetauschte Aminosäuren des Fragments ICP47(3-45) wurden hochgestellt.

Im Rahmen der ersten Arbeitshypothese wurde überprüft, ob das Glyzin-Prolin *Turn*-Motiv für die Aktivität von ICP47 essentiell ist. Dazu wurde die Mutante G18S/P19S synthetisiert. Zusätzlich wurde eine ICP47-Variante erzeugt (HSpH), bei der ein 16 Aminosäuren langer Abschnitt zwischen beiden vorhergesagten Helizes durch ein Glyzin-Serin-Segment ersetzt worden war (Abb. 26).

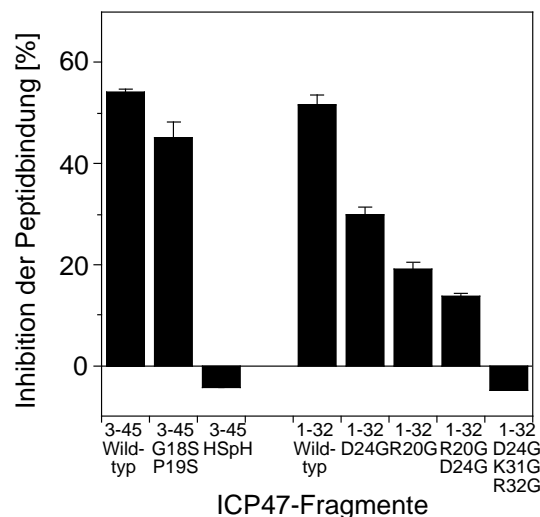


Abb. 27 Essentielle Aminosäuren innerhalb der aktiven Domäne von ICP47

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL in Gegenwart von 1 µM Wildtyp-Fragment (3-45), G18S/P19S bzw. HSpH oder 2,5 µM Wildtyp-Fragment ICP47(1-32), D24G, R20G, R20G/D24G bzw. D24G/K31G/R32G 45 min auf Eis inkubiert. Die Menge an gebundenem Reporterpeptid wurde quantifiziert und die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Kompetitionsexperimente zeigten, daß die Mutation G18S/P19S die Aktivität nahezu nicht beeinflusst, während die Variante HSpH nicht in der Lage war, die Peptidbindung an den TAP-Komplex zu blockieren (Abb. 27). Demzufolge ist weder das *Turn*-Motiv noch die Aminosäuren Glyzin oder Prolin an den Positionen 18 bzw. 19 für die Aktivität des viralen Inhibitors entscheidend. Auch die vorhergesagten α -Helizes allein sind für die Funktionalität von ICP47 nicht ausreichend. Das Segment zwischen den potentiellen α -Helizes dagegen scheint essentielle Aminosäuren zu beinhalten. Dieser Befund stützt die

zweite Arbeitshypothese. Es wurden ICP47-Varianten synthetisiert, bei denen konservierte geladenen Aminosäuren zwischen den beiden vorhergesagten α -Helizes an den Positionen 20, 24, 31 und 32 durch Glyzin ersetzt worden waren. Wie in Abbildung 27 gezeigt, führten die Einzelmutationen D24G bzw. R20G und die Doppelmutation R20G/D24G zu einem signifikanten Verlust der Aktivität. Die Trippelmutante D24G/K31G/R32G blockierte die Peptidbindung an den TAP-Komplex überhaupt nicht mehr. Demzufolge spielen die untersuchten geladenen Aminosäuren innerhalb der aktiven Domäne eine kritische Rolle. Inwiefern sie tatsächlich den freien N- und C-Terminus nachahmen, konnte allerdings nicht entschieden werden.

2.5 Chimären aus ICP47-1 und ICP47-2

Chimären, die aus zwei sequenzhomologen Proteinen mit unterschiedlicher Aktivität zusammengesetzt sind, stellen nützliche Hilfsmittel auf der Suche nach essentiellen Aminosäuren und kritischen Regionen dar.

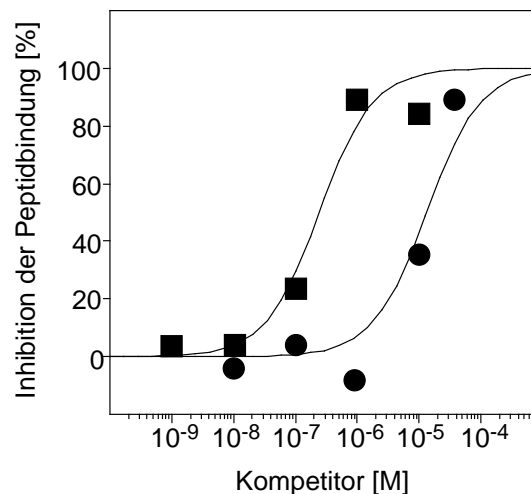


Abb. 28 ICP47-2 zeigt im Vergleich zu ICP47-1 eine 50-fach reduzierte Affinität zum TAP-Komplex

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL in Gegenwart steigender Konzentrationen ICP47(1-53)-1 (■) bzw. ICP47(1-53)-2 (●) 45 min auf Eis inkubiert. Die Menge gebundenen Reporterpeptids wurde quantifiziert, die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3) und mit Gleichung 4 approximiert. Für ICP47(1-53)-1 und ICP47(1-53)-2 wurden die Dissoziationskonstanten $K_d = 50 \pm 13$ nM bzw. $2,7 \pm 0,8$ μ M berechnet.

Wie in Abbildung 20A dargestellt, zeigt die Sequenz der HSV Typ2 (HSV2) kodierten ICP47-Variante (ICP47-2) (Whitton & Clements, 1984; Kohlstätter *et al.*, 1996) zwischen den Positionen 1 bis 52 bzw. 54 eine deutliche Homologie mit der bisher untersuchten

ICP47-Variante (ICP47-1) des HSV Typ1 (HSV1) (McGeoch *et al.*, 1988). Trotzdem wurde eine signifikant reduzierte Aktivität des ICP47(1-53)-2 Moleküls festgestellt (Abb. 28). Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten wurde eine mehr als 50-fach reduzierte Affinität von ICP47(1-53)-2 im Vergleich zu ICP47(1-53)-1 gemessen. Während in diesem Satz von Experimenten für ICP47(1-53)-1 eine Dissoziationskonstante $K_d = 50 \pm 13$ nM bestimmt wurde, ergab sich für ICP47(1-53)-2 der Wert $K_d = 2,7 \pm 0,8$ μ M.

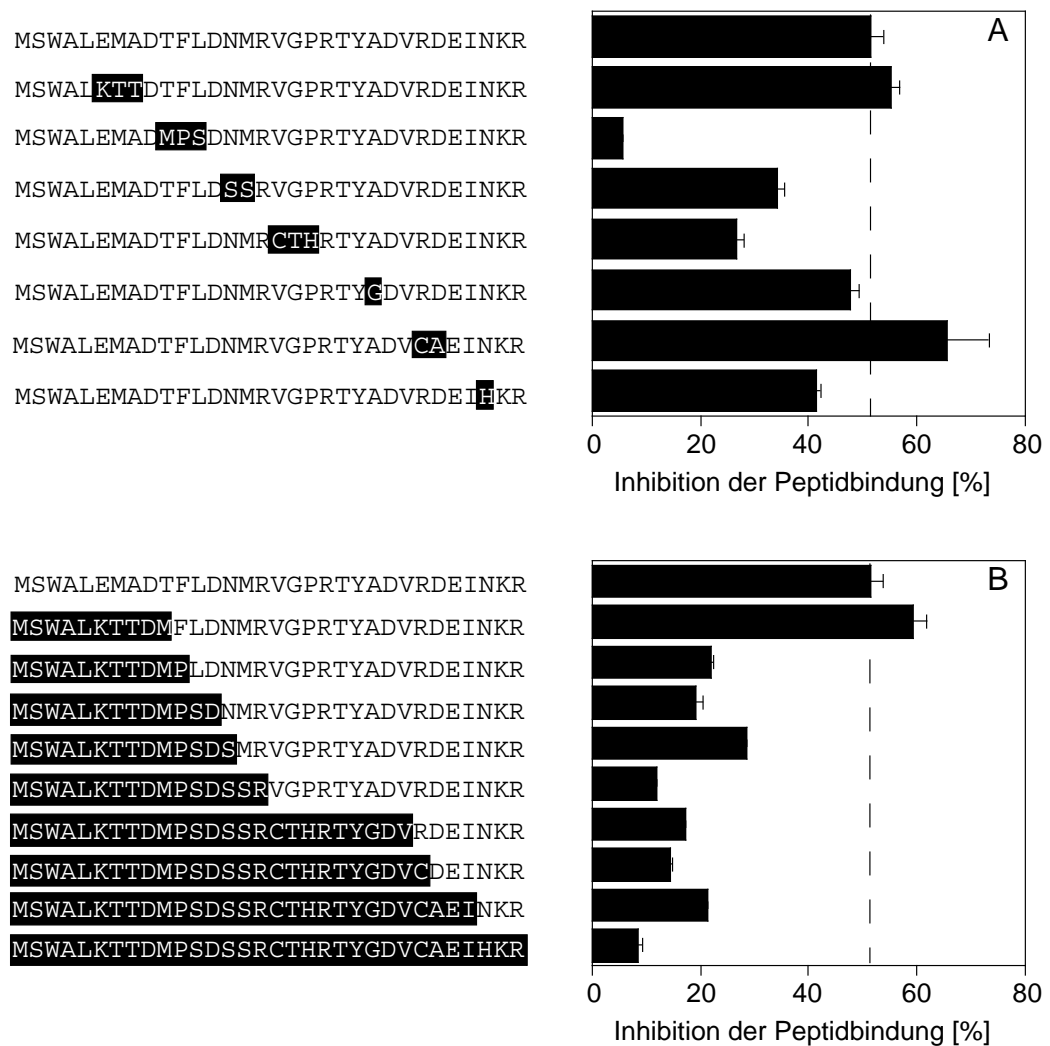


Abb. 29 Chimäre Moleküle aus ICP47-1 und ICP47-2

TAP-haltige Mikrosomen wurden mit 100 nM Reporterpeptid RR*YQKSTEL in Gegenwart von 2,5 μ M der ICP47-Varianten 45 min auf Eis inkubiert, die Menge gebundenen Peptids quantifiziert und die Inhibition der Peptidbindung berechnet (Gleichung 3). Es wurden ICP47-Varianten verwendet, bei denen nicht-konservierte Blöcke der Typ2-Sequenz in die Typ1-Sequenz eingebaut worden waren (A) und Chimäre, bei denen stufenweise die Typ1-Sequenz durch die Typ2-Sequenz ersetzt worden war (B). HSV2-kodierte Sequenzabschnitte wurden schwarz unterlegt. Die gestrichelte Linie deutet die Inhibition der Peptidbindung durch das unveränderte ICP47-1(1-32)-Molekül an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Für die Synthese der Hybridmoleküle wurde das kurze Fragment ICP47(1-32) ausgewählt, das die Mehrzahl der abweichenden Sequenzabschnitte innerhalb des konservierten N-Terminus enthält (Abb. 20A). Bei der Konstruktion der chimären Moleküle wurden zwei Ansätze verfolgt. Zuerst wurden einzelne nicht-konservierte Blöcke der Typ2-Sequenz in die Typ1-Sequenz eingebaut und deren Aktivität mit Konkurrenzexperimenten untersucht (Abb. 29A). Überraschenderweise wurde nur für die Chimäre, welche die Typ2-Sequenz "MPS" an den Positionen 10 bis 12 trug eine signifikante Abnahme der Aktivität beobachtet. Alle anderen untersuchten Chimären zeigten nur kleinere Aktivitätsschwankungen. Die Hybridmoleküle mit der Typ2 Sequenz "KTT" oder "CA" an den Positionen 6 bis 8 bzw. 26 bis 27 blockierten die Peptidbindung sogar mit einer etwas höheren Effizienz als das unveränderte Typ1-Fragment.

In einem zweiten Ansatz wurde die hoch-affine Typ1-Sequenz stufenweise durch die nieder-affine Typ2-Sequenz ersetzt (Abb. 29B). Während ICP47-Varianten, die an den Positionen 1 bis 10 die Typ2-Sequenz trugen die volle Aktivität zeigten, führte der Einbau des Typ2-kodierten Prolins an Position 11 zum Verlust der Fähigkeit die Peptidbindung zu inhibieren. Somit konnte der Prolinrest an Position 11 eindeutig für die schwache Aktivität von ICP47-2 verantwortlich gemacht werden. Alle anderen Sequenzunterschiede spielten dagegen eine untergeordnete Rolle.

2.6 Negativ geladene Membranen induzieren eine α -helikale Struktur von ICP47

Wie die Experimente mit chimären ICP47-Molekülen gezeigt haben, toleriert der virale Inhibitor kein Prolin an Position 11 innerhalb der N-terminalen vorhergesagten α -Helix. Da die Aminosäure Prolin dafür bekannt ist, die Ausbildung von α -Helizes zu verhindern, wurde vermutet, daß eine definierte Struktur von ICP47 für die Aktivität Voraussetzung ist. Aus diesem Grund wurde in einer Zusammenarbeit mit Dirk Beinert (AG Prof. R. Tampé) die Sekundärstruktur von ICP47 mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Für die CD-spektroskopischen Experimente wurde die konservierte und aktive Region ICP47(1-53) verwendet. Überraschenderweise zeigte das CD-Spektrum von 16 μ M ICP47(1-53) in Phosphatpuffer (pH 7,0) die typische Form eines Proteins mit Zufallsknäuelstruktur (Abb. 30). Um sicherzugehen, daß keine Konzentrations- oder pH-Effekte die korrekte Faltung des Polypeptids verhinderten, wurden die Messungen bei ICP47(1-53)-Konzentrationen zwischen 10 μ M und 80 μ M, bzw. bei pH-Werten zwischen 5,0 und 9,0 wiederholt. Bei allen untersuchten Bedingungen lag ICP47 unstrukturiert vor (Daten nicht gezeigt). Da ICP47 ein sehr hydrophobes Molekül darstellt, das sich gut in organischen Lösungsmitteln löst und zusätzlich mit einem membranständigen Protein interagiert, wurde als nächstes spekuliert, inwiefern eine lipid-

artige Umgebung zu einer Strukturierung des viralen Proteins führt. Aus diesem Grund wurden CD-Spektren von ICP47(1-53) in Gegenwart des Membranmimetikums Trifluor-ethanol (TFE) aufgenommen (Abb. 30A). Tatsächlich entwickelten die CD-Spektren mit steigender TFE-Konzentration das für α -helikale Strukturen typische Minimum bei 206 nm und die charakteristische Schulter bei 222 nm. Während ICP47(1-53) in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt, induziert eine lipidähnliche Umgebung eine α -helikale Konformation.

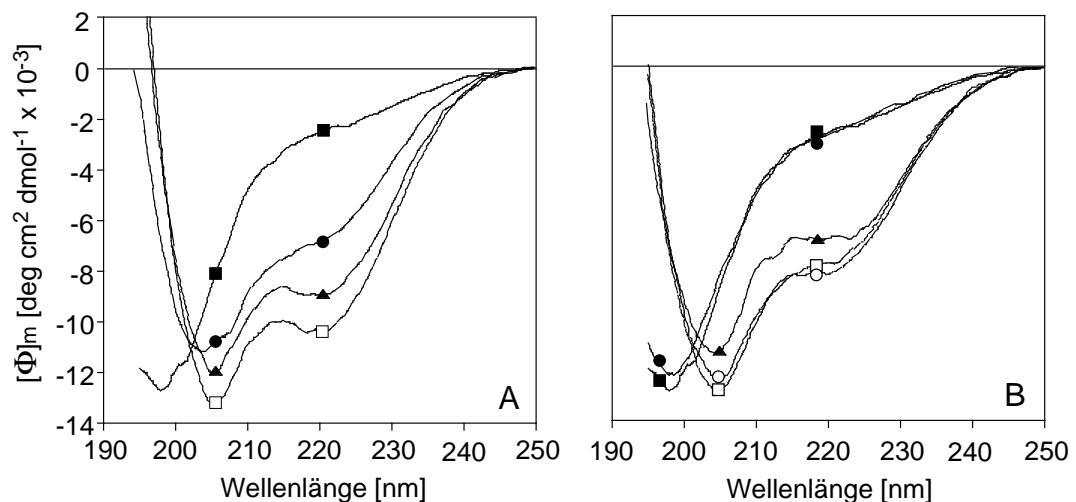


Abb. 30 CD-Spektren von ICP47(1-53) in Gegenwart von TFE und SDS

Es wurden CD-Spektren von 16 μ M ICP47(1-53) in Gegenwart von 0 (■), 20 (●), 30 (▲) und 40 % (v/v) (□) TFE (A) bzw. 0 (■), 0,1 (●), 0,5 (▲), 1,0 (□) und 10 mM (○) SDS (B) in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) bei 20°C aufgenommen. Alle dargestellten Spektren wurden durch Mittelung von zehn Einzelspektren geglättet und durch Subtraktion von Lösungsmittelspektren hintergrundkorrigiert.

Zusätzlich wurde die Sekundärstruktur von ICP47(1-53) in Gegenwart von Natriumdodezylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Mizellen untersucht, die ähnlich wie Membranen eine hydrophobe/hydrophile Grenzfläche bilden. Auch hier wurde oberhalb einer kritischen SDS-Konzentration eine drastische Änderung der ICP47-Konformation von einem Zufallsknäuel zu einer α -helikalen Struktur beobachtet (Abb 30B).

Da TFE und SDS Lipidmembranen nur unzureichend nachahmen und zusätzlich die intrinsische Eigenschaft haben α -helikale Strukturen zu induzieren, wurden CD-Spektren von ICP47(1-53) in Gegenwart von neutralen, positiv und negativ geladenen Membranen aufgenommen (Abb 31A). Dazu wurden Vesikel aus dem neutralen Lipid Dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholin (DMPC) bzw. aus Gemischen von DMPC und den negativ geladenen Lipiden Dilauryl-L- α -phosphat (DLPA) oder Dimyristoyl-L- α -phosphatidylglyzin (DMPG) präpariert. Positiv geladene Vesikel wurden aus den neutralen Lipiden Palmitoyloleoyl-L- α -phosphatidylcholin (POPC) und dem positiv geladenen Lipid

Dihexadezyldimethylammoniumbromid (DHDAB) hergestellt. Während ICP47(1-53) in Gegenwart von neutralen oder positiv geladenen Vesikeln keine definierte Proteinfaltung zeigte, induzierten negativ geladene Vesikel eine α -helikale Struktur. Um sicherzustellen, daß die negative Ladung und nicht die Interaktion mit einem speziellen Lipid für die veränderte ICP47(1-53)-Struktur verantwortlich ist, wurden bei der Vesikelpräparation unterschiedliche negativ geladene Lipide verwendet. Die Analyse der CD-Spektren zeigte allerdings, daß sowohl DLPA als auch DMPG-haltige Membranen eine Konformationsänderung von ICP47(1-53) induzieren (Abb. 31A).

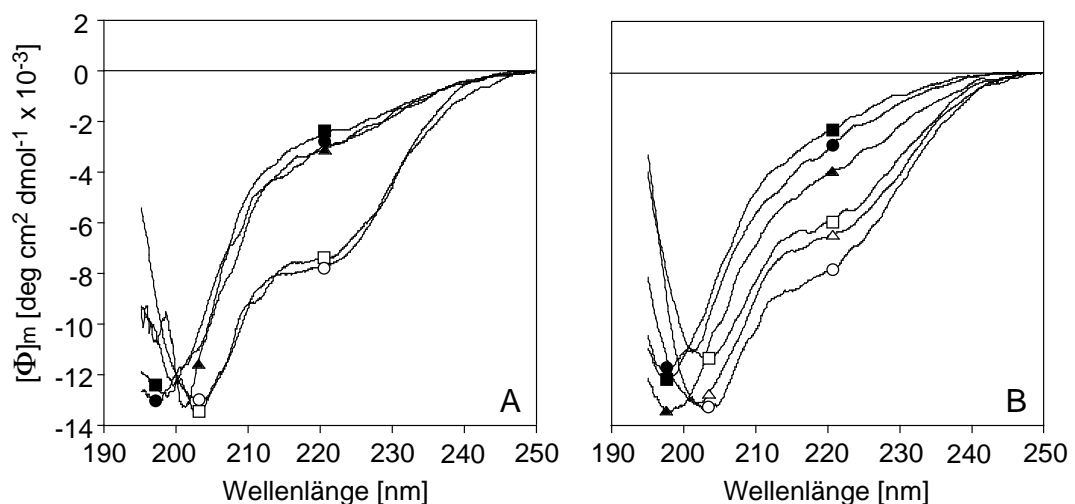


Abb. 31 CD-Spektren von ICP47(1-53) in Gegenwart von Membranen mit unterschiedlicher Ladung

(A) Es wurden CD-Spektren von 16 μ M ICP47(1-53) in Abwesenheit (■) und Gegenwart verschiedener Lipidvesikel in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) bei 37°C aufgenommen. Dafür wurden kleine unilaminare Vesikel aus dem neutralen Lipid DMPC (●), aus äquimolaren Mischungen des neutralen POPC mit dem positiv geladenem DHDAB (▲) bzw. äquimolaren Mischungen von DMPC mit den negativ geladenen Lipiden DLPA (□) und DMPG (○) präpariert (siehe Material und Methoden). (B) Zusätzlich wurden Spektren in Abwesenheit (■) und Gegenwart von DMPC-Vesikeln mit einem molaren Anteil des negativ geladenen Lipids DMPG von 0 (●), 25 (▲), 50 (□), 75 (○), und 100 % (Δ) aufgenommen. In allen Experimenten betrug die Lipidkonzentration 3 mM. Alle Spektren wurden durch Mittelung aus zehn Einzelspektren geglättet und durch Subtraktion der Spektren entsprechender vesikulärer Emulsionen hintergrundkorrigiert.

Um den Effekt der negativen Ladung genauer zu untersuchen, wurden CD-Spektren von ICP47(1-53) in Anwesenheit von DMPC-Vesikeln mit einem steigenden Anteil negativ geladener DMPG-Lipide analysiert (Abb. 31B). Da die Phasenübergangstemperatur von DMPC 23,5 und von DMPG 24°C beträgt, wurden alle Spektren bei 37°C aufgenommen. Wie erwartet, wurden keine Unterschiede der Spektrenform für ICP47(1-53) in wässrigem Puffer oder in Gegenwart von neutralen Vesikeln beobachtet. Eine steigende negative Ladungsdichte der Membranen führte allerdings zu einer zunehmenden Ausbildung des charakteristischen Minimums bei 206 und der Schulter bei 222 nm. Bei

einem molaren DMPG-Anteil von 75 % wurde ein Maximum der Helixformation festgestellt, während Vesikel, die zu 100 % aus DMPG bestanden, weniger effizient die α -helikale Struktur von ICP47(1-53) induzieren.

2.7 ICP47 bindet an negativ geladene Membranen

Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie legten die Vermutung nahe, daß die α -helikale Sekundärstruktur von ICP47(1-53) durch die Bindung an negativ geladene Membranen induziert wird. Da die CD-Daten aber lediglich den Konformationswechsel und nicht eine Bindung an die Membran bewiesen haben, wurde die Membranassoziation von ICP47 mit Hilfe von zwei unterschiedlichen experimentelle Ansätze gezeigt. Einerseits wurde der einzige Tryptophanrest an Position 3 von ICP47(1-53) als umgebungssensitive Sonde für eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung genutzt, andererseits wurde mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten direkt die Affinität der aktiven Domäne von ICP47 zu mikrosomalen Membranen bestimmt.

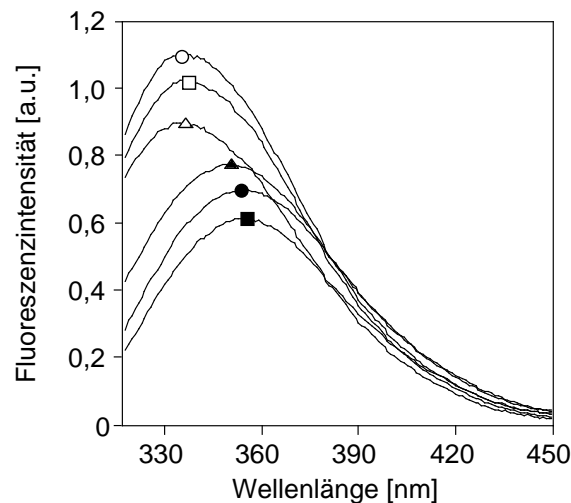


Abb. 32 Blauverschiebung des Tryptophan-Emissionssignals von ICP47(1-53) in Gegenwart von negativ geladenen Membranen

Es wurde die Tryptophan-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$) von $5,8 \mu\text{M}$ ICP47(1-53) in Abwesenheit (■) und Gegenwart von DMPC-Vesikeln mit einem steigenden molaren DMPG-Anteil von 0 (●), 25 (▲), 50 (□), 75 (○), und 100 % (Δ) bei 37°C in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Die Lipidkonzentration betrug 1,1 mM. Alle Spektren wurden mit Hilfe von identischen Lösungen in Abwesenheit von ICP47(1-53) hintergrundkorrigiert.

Da die Fluoreszenz des Fluorophors Tryptophan durch die Kollision mit Wassermolekülen gelöscht wird und zusätzlich die Lage des Emissionsmaximums von der Hydrophobizität der direkten Umgebung abhängt, bot der Tryptophanrest an Position 3 optimale Voraussetzungen, um die Wechselwirkung zwischen ICP47 und Membranen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden die Tryptophan-Emissionsspektren von ICP47(1-53) in Ab- und Anwesenheit von DMPC-Membranen, die einen steigenden Anteil von DMPG enthielten, aufgenommen. Wie in Abbildung 32 dargestellt, zeigte ICP47(1-53) in Abwesenheit von Membranen ein relativ schwaches rotverschobenes Emissionssignal. In Gegenwart von Vesikeln mit steigender negativer Ladungsdichte nahm die Fluoreszenzintensität deutlich zu. Das stärkste Emissionssignal wurde in Anwesenheit von Vesikeln beobachtet, die zu 75 % aus DMPG bestanden. Interessanterweise wurde die maximale Helixbildung ebenfalls durch Membranen dieser Ladungsdichte hervorgerufen (Abb. 31B). Neben der Fluoreszenzzunahme wurde zusätzlich eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu niedrigeren Wellenlängen in Gegenwart von Vesikeln mit steigender negativer Ladungsdichte festgestellt (Abb. 32). Während der Tryptophanrest in Abwesenheit von Membranen dem polaren wässrigen Milieu ausgesetzt ist, befindet er sich in Gegenwart von negativ geladenen Membranen in einer hydrophoben Umgebung, die den Fluorophor vor Kollisionen mit Wassermolekülen schützt. Sowohl das reduzierte Fluoreszenzsignal als auch die Verschiebung des Emissionsmaximums implizieren, daß der virale Inhibitor ICP47 an die Membran bindet.

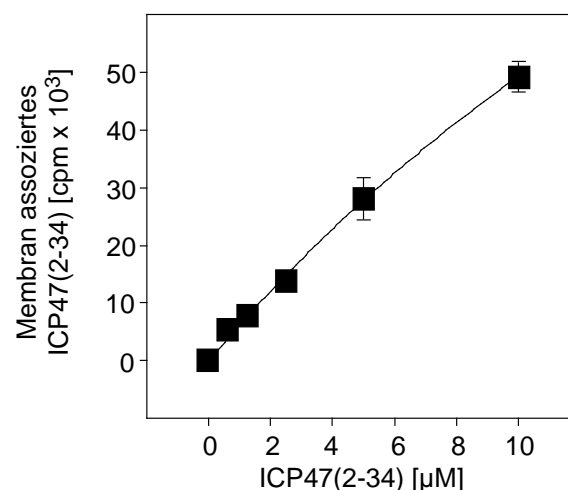


Abb. 33 ICP47(2-34) bindet an mikrosomale Membranen

Mikrosomen, die aus nicht-infizierten Sf9-Zellen präpariert worden waren, wurden mit einer steigenden Konzentration an ^{125}I -markiertem ICP47(2-34) 15 min bei 20°C inkubiert. Nachdem die Mikrosomen gewaschen worden waren, wurden die Membran assoziierte Radioaktivität mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert. Die Dissoziationskonstante $K_d = 34 \pm 9 \mu\text{M}$ wurde durch Approximation mit Gleichung 2 berechnet.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde die Membranassoziation der aktiven Domäne ICP47(2-34) direkt untersucht. Dafür wurden Mikrosomen, die keinen TAP-Komplex enthielten aus nicht-infizierten Sf9-Zellen präpariert und mit einer steigenden Konzentration ^{125}I -markiertem ICP47(2-34) inkubiert. Nachdem die Mikrosomen gewaschen worden waren, wurde Membran assoziiertes ICP47(2-34) quantifiziert und gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 33). Durch Approximation der Daten mit Gleichung 2 wurde eine Dissoziationskonstante $K_d = 34 \pm 9 \mu\text{M}$ berechnet. Somit konnte eine Bindung der aktiven Domäne ICP47(2-34) an natürliche mikrosomale Membranen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte ICP47(2-34) eine 350 bis 400-fach schwächere Affinität zu Mikrosomen, die kein TAP enthielten, als zu Mikrosomen, die aus TAP-exprimierenden Sf9-Zellen isoliert worden waren.

2.8 NMR-Struktur der aktiven Domäne von ICP47

Da es sich bei der aktiven Domäne um eine kurzes Polypeptid handelt, konnte deren membraninduzierte Struktur mit Kernspinresonanz-(*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie untersucht werden.

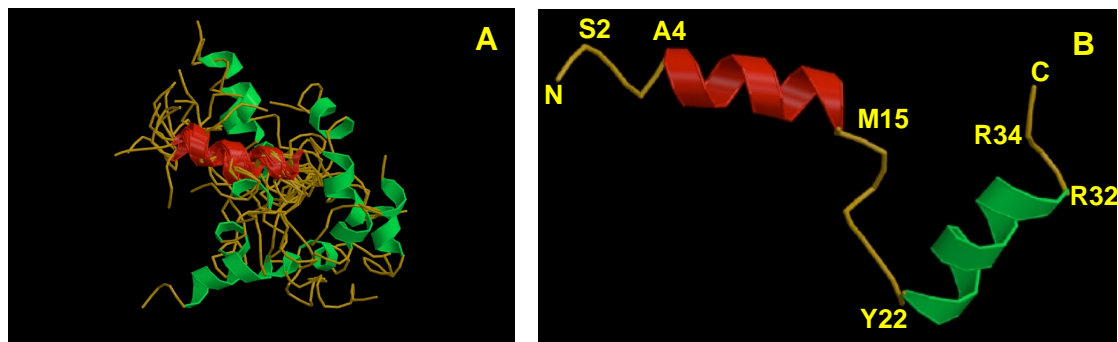


Abb. 34 NMR-Struktur der aktiven Domäne von ICP47

(A) Mit Hilfe des Programms Molscript 3.0 wurden die Strukturen von ICP47(2-34) dargestellt, die mit den NMR-Daten am besten übereinstimmten. Die N-terminalen α -Helizes (rot) wurden übereinandergelegt, während die C-terminalen α -Helizes (grün) ihrer relativen Lage nach abgebildet wurden. (B) Mit Hilfe des Programms XPLOR 3.1 wurde die Struktur mit der geringsten Energie berechnet.

Um die artifizielle positive Ladung in direkter Nachbarschaft zum essentiellen Tryptophan an Position 3 zu vermeiden, wurden diese Experimente mit der elongierten aktiven Domäne ICP47(2-34) durchgeführt. In einer Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. T. A. Holak (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) wurden NMR-Spektren von 4,3 mM ICP47(2-34) in Gegenwart von 560 nM deuteriertem SDS in 90 % H_2O / 10 % D_2O aufgenommen und ausgewertet. Die Analyse der NOESY-Spektren ergab für

die Region zwischen den Position 4 und 15 bzw. 22 und 32 die für eine α -helikale Struktur charakteristischen NOEs $H^\alpha(i)-H^N(i+3)$, $H^\alpha(i)-H^N(i+4)$ und $H^\alpha(i)-H^\beta(i+3)$. Beide α -Helizes sind durch eine sechs Aminosäuren lange Schleife voneinander getrennt. Über die relative Orientierung der beiden α -Helizes konnte keine Aussage gemacht werden, da keine NOEs für die Aminosäuren innerhalb der Schleife gefunden wurden. Eine direkte Interaktion der beiden α -Helizes wurde allerdings ausgeschlossen, da ebenfalls keine NOEs zwischen den Aminosäuren der beiden α -helikalen Regionen auftraten. Die Strukturen, die am besten mit den NMR-Daten übereinstimmen, wurden in Abbildung 34A dargestellt. Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten, wurden die N-terminalen α -Helizes übereinandergelegt. Anschließend wurde mit Hilfe des Programms XPLOR 3.1 die Struktur mit der niedrigsten Energie berechnet (Abb. 34B).

D. Diskussion

1. Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes

Der TAP-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation. Zusätzlich dient der Antigenpeptid-Transporter als Modell für eng verwandte ABC-Transporter, die in weitere medizinisch relevante Prozesse wie Multidrogenresistenz (MDR1) (Endicott & Ling, 1989; Gottesmann & Pastan, 1993), Mukoviszidose (CFTR) (Collins, 1992), Tangier-Krankheit (ABC1) (Rust *et al.*, 1999), Morbus Stargardt (ABCR) (Sun & Nathans, 2000) oder Adrenoleukodystrophie (ALDP) (Kamijo *et al.*, 1990) involviert sind. Der Transportmechanismus des TAP-Komplexes kann in zwei grundlegende Schritte unterteilt werden; die ATP-unabhängige Peptidbindung und den ATP-abhängigen Peptidtransport. Im ersten Teilprojekt der vorliegenden Dissertation wurde der initiale Schritt des Peptidtransports, die Bildung und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes, untersucht.

Die Eigenschaft des Antigenpeptid-Transporters Peptide mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten zu tolerieren (Grommé *et al.*, 1997; Uebel *et al.*, 1995; Uebel *et al.*, 1997; Blevitt *et al.*, 1999), ermöglichte die Verwendung von umgebungssensitiven Sonden. So wurden Peptide, die an einer geeigneten Position den Fluorophor Fluoreszein trugen, unverändert gebunden (Abb. 7) und transportiert (Abb. 8). Darüberhinaus wurde eine Fluoreszenzlöschung bei der Assoziation von Fluoreszein-Peptid mit dem TAP-Komplex beobachtet (Abb. 9). Mit dieser Methode konnte die Peptid-TAP-Wechselwirkung in Echtzeit und in homogener Lösung studiert werden. Somit war es erstmals möglich exakte Gleichgewichtskonstanten für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes zu bestimmen, da auf die Trennung von gebundenem und ungebundenem Peptid verzichtet werden konnte. Überraschenderweise zeigte sich, daß die Peptide mit einer ca. zehnfach höheren Affinität an den TAP-Komplex binden, als aufgrund heterogener Bestimmungsmethoden vermutet worden war. So wurde für das Peptid RRYΦKSTEL mit einem heterogenen Sättigungsbindungsexperiment ein Wert $K_d = 93 \pm 9$ nM bestimmt (Abb. 7), während kinetische Analysen bzw. Methoden, die auf der konzentrationsabhängigen Änderung der Fluoreszenzintensität beruhen Gleichgewichtskonstanten $K_d = 9,1 \pm 1,6$ nM bzw. 12 ± 1 nM ergaben (Tab. 1). Diese Diskrepanz ist auf die Verdünnungsschritte, die für das effiziente Waschen der Mikrosomen notwendig sind und den Zentrifugationsschritt zurückzuführen (siehe Material und Methoden).

Die Analyse der monoexponentiellen Assoziationskinetik, zeigte eine hyperbole Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{app} von der Peptidkonzentration (Abb 12A). Dies deutete daraufhin, daß sich die Assoziation aus einem

schnellen bimolekularen Peptidbindungsschritt und einem langsamen unimolekularen Konformationswechsel zusammensetzt (Hiromi, 1979). Vergleichbare Zweistufenprozesse wurden bereits für zahlreiche Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen gefunden wie z.B. für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor und dem Toxin der grünen Mamba (Toomela *et al.*, 1994) oder Lysozym und N-Acetylglucosamin (Holler *et al.*, 1969). Aus dem streng monoexponentialen Fluoreszenzabfall bei der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes folgt, daß ausschließlich einer der beiden Schritte die Fluoreszenzintensität beeinflusst. Da nur für die Isomerisierung eine sättigbare Geschwindigkeitskonstante erwartet wird, während der Bindungsschritt linear von der Konzentration abhängt, kann der Isomerisierungsschritt für die Fluoreszenzlöschung verantwortlich gemacht werden. Die Analyse der Spektrenform von TAP-gebundenem und ungebundenem Peptid zeigte, daß die Fluoreszenzabnahme durch einen lokal erniedrigten pH-Wert hervorgerufen wird (Abb. 18). Zusätzlich wurde die deutlichste Fluoreszenzabnahme bei Peptiden gemessen, die den Fluorophor an den Positionen 2, 3 oder 4 trugen. Aber auch bei Peptiden, die an den Positionen 5 bis 8 markiert worden waren, wurde noch eine signifikante Fluoreszenzlöschung beobachtet (Abb. 10). Diese weiträumige Beeinflussung der Fluoreszenz deutet daraufhin, daß ein Cluster von Protonendonorguppen nach der Konformationsänderung in der Nähe des Peptids zu liegen kommt. Um welche Aminosäuren es sich dabei handelt, kann aufgrund fehlender detaillierter Strukturinformationen über den TAP-Komplex nicht beantwortet werden.

Weitere thermodynamische und kinetische Studien belegten mehrfach, daß es sich bei diesem peptidinduzierten Konformationswechsel um eine drastische Reorganisation der TAP-Struktur handelt. So lassen sich die hohen Aktivierungsenergien, die für die Assoziation und Dissoziation des Peptid-TAP-Komplexes bestimmt worden waren (Abb. 14), mit einer umfassenden Umstrukturierung erklären. Bei einem signifikanten Konformationswechsel ist eine deutliche Energiebarriere zu erwarten, da zahlreiche Bindungen wie Salzbrücken, van-der-Waals Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brücken-Bindungen gelöst werden müssen, bevor Wechselwirkungen zwischen anderen Aminosäureresten des TAP-Moleküls die neue Struktur stabilisieren. Noch eindeutiger dokumentierte die ungewöhnlich große Wärmekapazitätsänderung während der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes den weitreichenden Konformationswechsel (Abb. 16). Eine positive Wärmekapazitätsänderung im Zusammenhang mit Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen läßt sich auf eine Erhöhung der Hydrophobizität der wasserzugänglichen Proteinoberfläche zurückführen (Spolar *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1990; Spolar *et al.*, 1992; Pivalov *et al.*, 1992; Spolar & Record, 1994). Um die Oberflächenhydrophobizität in diesem Ausmaß zu erhöhen, sind drastische Molekülbewegungen notwendig, die entweder hydrophobe Seitenketten an die Proteinoberfläche oder hydrophile ins Proteininneren bewegen. Neben den bisher ange-

fürten qualitativen Aussagen über die Konformationsänderung, bietet die semi-empirische Gleichung von Spolar und Record (1994) (Gleichung 22) eine Möglichkeit die Zahl der beteiligten Aminosäuren abzuschätzen. Es wurde berechnet, daß mehr als jede vierte Aminosäure an der Reorganisation des Peptid-TAP-Komplexes beteiligt ist. 27 % der TAP-Struktur werden umgebaut. Diese dramatische Konformationswechsel legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der peptidinduzierten Struktur des Antigenpeptid-Transporters um ein essentielles Intermediat innerhalb des Transportzyklusses handelt. Die Interpretation der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten gibt Auskunft über die Funktion der Konformationsänderung. So wurde beispielsweise für die zweistufige Assoziation des Mambatoxins an den muskarinischen Acetylcholinrezeptor eine Gleichgewichtskonstante für den Gesamtprozeß von $K_{\text{ges}} = 10 \text{ nM}$ gemessen, obwohl die Dissoziationskonstante des Bindungsschritts nur $K_{-1} = 1,4 \text{ }\mu\text{M}$ beträgt. Die Ursache für die hohe Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor wurde in der vergleichsweise langsamen Rückreaktion der Isomerisierung gefunden. Für diesen Schritt wurde eine Gleichgewichtskonstante $K_{+2} = k_{+2}/k_{-2} = 140$ berechnet (Toomela *et al.*, 1994). Für die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes ist die Gleichgewichtskonstante $K_{\text{ges}} = 12 \pm 1 \text{ nM}$ dagegen ist nur wenig kleiner als die Gleichgewichtskonstante des ersten Teilschritts $K_{-1} = 32 \pm 3 \text{ nM}$. Die Hin- und Rückreaktion des Konformationswechsels sind nahezu gleich schnell und die Gleichgewichtskonstante dieses zweiten Teilschritts beträgt nur $K_{+2} = 2,6 \pm 0,2$ (Tab. 1). Im Gegensatz zur Wechselwirkung des Mambatoxins mit dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor beeinflusst die Konformationsänderung des TAP-Komplexes die Substrataffinität daher nur geringfügig. Der kürzliche Nachweis, daß die ATP-Hydrolyse durch den TAP-Komplex in Gegenwart von Peptiden stimuliert wird (S. Gorbulev & R. Tampé, unveröffentlichte Daten), deutet auf eine alternative Funktion des Konformationswechsels hin. Möglicherweise dient die Umstrukturierung des Antigenpeptid-Transporters der intramolekularen Kommunikation, indem den Nukleotidbindungsdomänen die Beladung der Peptidbindungsstelle signalisiert wird. Somit entspricht der umorganisierte Peptid-TAP-Komplex einer essentiellen Zwischenstufe innerhalb des Transportzyklusses, welcher die strukturellen Voraussetzungen für die ATP-Hydrolyse und den anschließenden Peptidtransport besitzt. Ein solcher Mechanismus erscheint sinnvoll, da eine Kopplung von Substratbindung und ATP-Hydrolyse der Verschwendung von ATP vorbeugt. Eines der ersten Beispiele für eine Konformationsänderung, die vorzeitige ATP-Hydrolyse verhindert, war der *induced fit*-Mechanismus der Glukose-Hexokinase-Interaktion (Anderson *et al.*, 1979). Zusätzlich kann spekuliert werden, daß das Peptid während der Umstrukturierung bereits von der zytosolischen Seite der Membran in Richtung ER-Lumen bewegt wird, um den eigentlichen Translokationsschritt vorzubereiten. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann das bisher vorgeschlagene

Minimalmodell des TAP-vermittelten Peptidtransports (Abb. 5) erweitert werden wie in Abbildung 35 dargestellt.

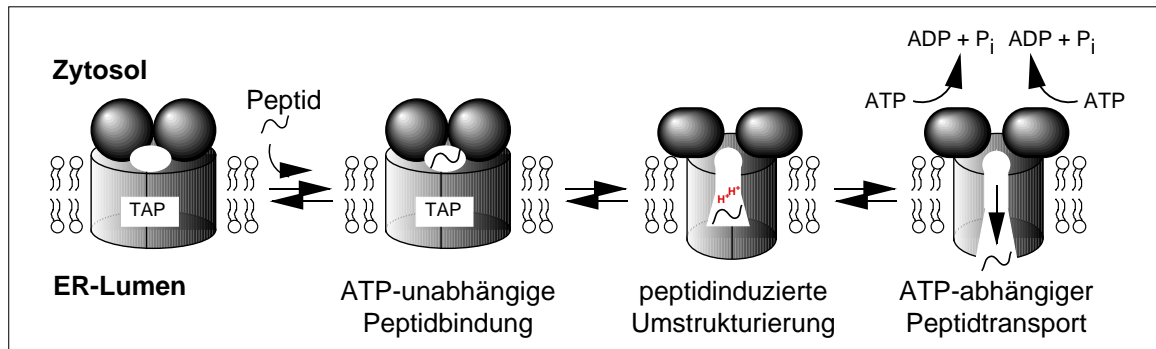


Abb. 35 Erweitertes Modell für den TAP-vermittelten Peptidtransport

Die ATP-unabhängige Peptidbindung induziert einen Konformationswechsel des TAP-Komplexes. Dabei wird ca. ein Viertel der TAP-Struktur umorganisiert. Zusätzlich gelangen Protonendonorguppen (rot) in die unmittelbare Nähe des gebundenen Peptids. Der Konformationswechsel signalisiert möglicherweise die Peptidbeladung der Peptidbindungsstelle und schafft die strukturellen Voraussetzungen für die ATP-Hydrolyse und den Peptidtransport.

Mit Hilfe des entropieanalytischen Ansatzes von Spolar und Record (1994) wurde eine deutliche Zunahme des Entropieterms $\Delta S^\circ_{\text{Konf}}$ bestimmt. Da $\Delta S^\circ_{\text{Konf}}$ die Entropieänderungen berücksichtigt, die auf eine Konformationsänderung zurückzuführen sind, gilt diese Größe als Maß für die strukturelle Umorganisation. Über die molekularen Ursachen für die Entropiezunahme bei der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes kann nur spekuliert werden. Eine Quelle für Entropie wäre die Freisetzung von Wassermolekülen, die geordnet an der Proteinoberfläche koordiniert waren. Eine andere Möglichkeit die Entropie zu erhöhen, ist die Ausbildung einer flexibleren TAP-Struktur. Die erste Annahme ist interessant, weil sie einen Weg aufzeigt, die erstaunliche Substratvielfalt des TAP-Komplexes zu erklären. So wurde die Entropiezunahme bei der Bindung unterschiedlicher Oligopeptide an das periplasmatische Oligopeptidbindungsprotein OppA auf die Verdrängung von Wassermolekülen zurückgeführt, die an der Oberfläche der Substratbindungstasche strukturiert gebunden waren. Die Auskleidung der Oligopeptidbindungstasche mit Wassermolekülen erwies sich als notwendig, um die Bindung zwischen den verschiedenen Seitenketten unterschiedlicher Oligopeptide und den Aminosäureresten der Substratbindungsstelle zu vermitteln (Tame *et al.*, 1996). Die geringe Größe, seine hohe Polarisierbarkeit und die Fähigkeit sowohl als Wasserstoffbrückendonator als auch als Akzeptor zu fungieren, machen das Wassermolekül zur optimalen Adapterstruktur für Substrate verschiedener Größe, Form und Ladung. Unter Berücksichtigung der Höhe der Entropiezunahme bei der Peptid-TAP-Assoziation erscheint es unwahrscheinlich, daß die Freisetzung von Oberflächenwasser die einzige

Entropiequelle darstellt. Für die Bindung eines trimeren Peptids an das OppA-Protein wurden lediglich Entropiezunahmen von 0,17 bis 0,21 kJ mol⁻¹ K⁻¹ gemessen. Bei diesen Prozessen wurden vier bis sieben Wassermoleküle freigesetzt (Tame *et al.*, 1996). Entweder dissoziieren bei der Bildung des Peptid-TAP-Komplexes deutlich mehr Wassermoleküle oder der TAP-Komplex nimmt zusätzlich eine flexiblere Struktur an. Interessanterweise wurde eine Flexibilität der Struktur des ABC-Transporters Histidinpermease berichtet, der seine ATPase-Aktivität durch eine partielle Lösung der Bindung zu den Nukleotidbindungsdomänen moduliert (Liu *et al.*, 1999). Da ein solcher Immobilisierungsprozeß der Nukleotidbindungsdomänen die Entropie erhöhen würde, kann darüber spekuliert werden, inwiefern der TAP-Komplex seine ATPase-Aktivität vergleichbar reguliert.

2. Aktive Domäne, kritische Regionen und strukturelle Aspekte von ICP47

Das *Herpes Simplex Virus* (HSV)-Protein ICP47 blockiert den Peptidbindungsschritt an den TAP-Komplex und verhindert somit die Präsentation von Proteinfragmenten viralen Ursprungs. Diese Strategie bildet die molekulare Grundlage für die fehlende Immunerkennung des HSV und seine lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus. Im zweiten Teilprojekt dieser Dissertation wurde nach essentiellen Regionen und den molekularen Wirkprinzipien des 88 Aminosäuren langen Proteins ICP47 gesucht.

In einem ersten experimentellen Ansatz wurde die Aktivität von sechs überlappenden, 25 Aminosäure langen ICP47-Fragmenten analysiert. Das Versagen aller 25mer allein oder in Kombination, die Peptidbindung an den TAP-Komplex zu inhibieren bzw. die Wechselwirkung zwischen dem TAP-Komplex und Wildtyp-ICP47 zu stören (Abb. 19), deutete daraufhin, daß eine größere zusammenhängende Einheit des viralen Inhibitors für seine Funktionalität Voraussetzung ist. Strukturvorhersagen und Sequenzvergleiche von ICP47-Varianten aus verschiedenen HSV-Stämmen unterstrichen die Bedeutung der N-terminalen Region des Proteins. Die N-terminalen zwei Drittel der ICP47-Sequenz sind hochkonserviert, während im C-terminalen Bereich kaum Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten ICP47-Molekülen gefunden wurden (Abb. 20A). Zusätzlich wurde innerhalb der konservierten Region ein Helix-Turn-Helix Motiv vorhergesagt (Abb. 20B). Aktivitätstests bestätigten, daß dieses auffällige Segment ICP47(1-53) tatsächlich für alle vier bekannten Aktivitätscharakteristika des viralen Inhibitors verantwortlich ist. Weder in der Blockierung der Peptidbindung (Abb. 23) oder des Peptidtransports (Abb. 21) noch in der Bindungsaffinität (Abb. 22) zum TAP-Komplex oder in der Spezifität für den humanen Antigenpeptid-Transporter (Abb. 24) konnten Unterschiede zwischen dem

konservierten Fragment ICP47(1-53) und Wildtyp-ICP47 festgestellt werden. Weitere systematische C-terminale Verkürzungen des viralen Polypeptids zeigten, daß neben der schwach konservierten Region zusätzlich fast 40 % der hochkonservierten Aminosäuren, einschließlich der vorhergesagten C-terminalen α -Helix ohne Folgen für die Funktionalität deletiert werden konnten. Erst ICP47-Fragmente, denen das Arginin an Position 34 fehlte, blockierten die Peptidbindung an den TAP-Komplex mit geringerer Effizienz (Abb 25B). N-terminale Verkürzungen führten dagegen bereits durch Deletion des Tryptophanrests an Position 3 am Beginn der vorhergesagten N-terminalen α -Helix zu einer signifikant reduzierten Aktivität (Abb. 25A). Durch die Kombination der Daten konnte schließlich das Fragment ICP47(3-34) als aktive Domäne bezüglich der Inhibierung des TAP-Komplexes identifiziert werden (Tab. 3). Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die Arbeiten von Galocha *et al.* (1997) gestützt, die die Aktivität von systematisch verkürzten ICP47-Fragmenten mit Hilfe von Transportinhibitions-experimente untersuchten.

Nachdem das minimale aktive ICP47-Fragment determiniert worden war, wurden mit Hilfe von Mutationsstudien kritische Aminosäurereste innerhalb dieser Region identifiziert. Konkurrenzexperimente zeigten, daß ein Muster geladener Aminosäuren für die Aktivität entscheidend ist. So führten sowohl die Substitutionen des Arginins als auch des Aspartats an den Positionen 20 bzw. 24 durch Glyzin zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität. Die dreifach Mutante D24G/K31G/R32G hatte die Eigenschaft, die Peptidbindung an den TAP-Komplex zu blockieren, vollständig verloren (Abb. 27). Die Bedeutung dieser geladenen Aminosäuren wird zusätzlich durch ihre strikte Konservierung in allen untersuchten ICP47-Varianten (Abb. 20A) unterstrichen. Das Versagen des Fragments ICP47(14-38), den TAP-Komplex zu inhibieren (Abb. 19), obwohl es nahezu alle konservierten geladenen Aminosäuren enthält, ließ allerdings erkennen, daß diese Aminosäuren zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Funktion von ICP47 sind. Zusätzliche Charakteristika sind für die Aktivität erforderlich. Experimente mit chimären ICP47-Polypeptiden aus HSV Typ1- und Typ2-kodierten ICP47-Varianten, deuteten daraufhin, daß es sich hierbei nicht um einzelne essentielle Aminosäuren, sondern um strukturelle Besonderheiten handelt. So konnte der signifikante Aktivitätsunterschied zwischen ICP47-1 und ICP47-2 (Abb. 28) allein auf den Prolinrest an Position 11 zurückgeführt werden (Abb 29). Da dieser Prolinrest innerhalb der vorhergesagten N-terminalen α -Helix liegt (Abb. 20B) und Prolin bekanntermaßen die Ausbildung von α -Helizes verhindert, wurde die Struktur von ICP47 mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Überraschenderweise lag ICP47 in wässriger Lösung als Zufallsknäuel vor (Abb 30, 31), während erst in der Gegenwart von Membranmimetika wie TFE oder SDS eine α -helikale Sekundärstruktur nachgewiesen werden konnte (Abb. 30). Besonders auffällig war die sprunghafte

Ausbildung der α -helikalen ICP47-Konformation bei einer SDS-Konzentration oberhalb 0,5 mM. Lichtstreuexperimente zeigten, daß unter den verwendeten experimentellen Bedingungen die kritische mizellare Konzentration (CMC) von SDS in diesen Bereich fällt (Daten nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, daß die Wechselwirkung von ICP47 mit den SDS-Mizellen für die Stabilisierung der α -helikalen Struktur verantwortlich ist. Die biologische Relevanz dieses Konformationswechsels wurde mit Hilfe von neutralen, positiv oder negativ geladenen Lipidmembranen untersucht. Interessanterweise waren ausschließlich negativ geladenen Membranen in der Lage die α -helikale ICP47-Struktur zu induzieren. Durch Verwendung verschiedener Lipide als Träger der negativen Ladung wurde sichergestellt, daß die Ladung und nicht ein bestimmtes Lipid Voraussetzung für den Konformationswechsel ist (Abb. 31A). Ab einer Ladungsdichte von 25 % (mol/mol) an negativen Lipiden wurde ein deutlicher α -helikaler Anteil von ICP47 beobachtet (Abb. 31B). *In vivo* interagiert ICP47 mit dem TAP-Komplex, der in der ER-Membran lokalisiert ist. Da die ER-Membran zu 22 % aus negativ geladenen Lipiden (48 % Phosphatidylcholin, 24 % Phosphatidylethanolamin, 12 % Phosphatidylinositol, 5 % Phosphatidylserin, 5 % Sphingomyelin und 6 % weiteren Lipiden) besteht (Yorek, 1993), ist davon auszugehen, daß ICP47 in seiner α -helikalen Konformation mit dem Antigenpeptid-Transporter TAP wechselwirkt. Vergleichbare Eigenschaften wurden z.B. für die Signalsequenzen des *E.coli* Hemolysins A und des *Pasteurella* Leukotoxins gefunden (Sheps *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Obwohl beide Polypeptide keine Homologie mit ICP47 aufweisen, liegen auch sie in wässriger Lösung unstrukturiert vor, während TFE, SDS und negativ geladene Membranen eine α -helikale Konformation induzieren. Somit scheint es sich bei dem membraninduzierten Konformationswechsel um ein weitverbreitetes Strukturierungsprinzip zu handeln.

Während die CD-Daten die direkte Bindung von ICP47 an die Membran lediglich implizieren, belegten fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen und Sättigungsbindungsexperimente eindeutig eine Membranassoziation. So wurde eine signifikante Fluoreszenzzunahme des einzigen Tryptophanrests an Position 3 in Gegenwart negativ geladener Membranen beobachtet. Zusätzlich verschob sich das Emissionsmaximum zu niedrigeren Wellenlängen (Abb. 32). Daraus folgt, daß der Tryptophanrest in wässriger Umgebung frei zugänglich ist und die Fluoreszenz durch Kollision mit Wassermolekülen gelöscht wird. In Anwesenheit von negativ geladenen Membranen ist der Tryptophanrest dagegen gegen die Lösungsmittelmoleküle abgeschirmt. Die Blauverschiebung des Emissionssignals belegt, daß diese Abschirmung durch eine Bindung an die Membran hervorgerufen wird, wobei das Tryptophan in eine hydrophobe Umgebung eindringt. Mit Hilfe direkter Bindungsstudien der aktiven Domäne von ICP47 an ER-Membranen wurde eine Dissoziationskonstante von $K_d = 34 \pm 9 \mu\text{M}$ bestimmt (Abb. 33).

Alle gezeigten CD- und fluoreszenzspektroskopischen Versuche wurden bei 37°C durchgeführt um sicherzustellen, daß die Membran in ihrem fluiden Zustand vorliegt. Experimente bei niedrigeren Temperaturen zeigten allerdings, daß auch kristalline Membranen den Konformationswechsel von ICP47 induzieren können (Daten nicht gezeigt). Da der Einbau einer α -Helix in eine dicht gepackte kristalline Lipidschicht sowohl energetisch als auch sterisch stark gehemmt ist, ist davon auszugehen, daß die α -Helix nicht senkrecht in die Membran eintaucht, sondern parallel an die äußere Lipidschicht adsorbiert.

Schließlich wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. T. Holak (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) die NMR-Struktur der membrangebundenen aktiven Domäne von ICP47 gelöst. Es wurden zwei α -helikale Bereiche zwischen den Positionen 4 und 15 sowie 22 und 32 identifiziert. Beide α -Helizes sind durch eine flexible Schleife verbunden, die eine unabhängige Bewegung beider α -helikalen Bereiche erlaubt (Abb. 34). Über die relative Lage beider α -Helizes konnte aufgrund fehlender NOEs keine Aussage gemacht werden. Interessanterweise wurde die N-terminale α -Helix von den verwendeten Algorithmen korrekt vorhergesagt, während die zweite gefundene α -Helix nicht berechnet worden war (Abb. 20B).

Basierend auf den vorgestellten Daten kann folgendes Modell der ICP47-TAP-Wechselwirkung aufgestellt werden (Abb. 36). Das ICP47-Molekül gliedert sich in drei funktionale Einheiten. Die erste Einheit wird durch die essentielle N-terminale α -Helix gebildet. Jede Störung der Helixbildung, sowohl durch teilweise Verkürzung als auch durch Einbau eines Prolinrests, führt zum Verlust der Aktivität. Ferner wurde gezeigt, daß zumindest der Tryptophanrest am Beginn der α -Helix direkt an die Membran adsorbiert. Es ist anzunehmen, daß die erste Einheit als Membrananker dient, um die lokale ICP47-Konzentration in der unmittelbaren Nähe des TAP-Komplexes zu erhöhen und um die Strukturierung des zweiten funktionalen Elements zu induzieren. Diese zweite entscheidende Region wird durch die C-terminale α -Helix gebildet und ist für die eigentliche Inhibierung der Peptidbindung verantwortlich. Es wird angenommen, daß dieses Segment über ein Muster geladener, essentieller Aminosäuren direkt die Peptidbindungsstelle blockiert. Da der TAP-Komplex Peptide u.a. über ihre freien N- und C-Termini bindet (Momburg *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 1994), liegt die Vermutung nahe, daß die Amino- bzw. Carboxylgruppen der Seitenketten die Peptidtermini imitieren. Interessanterweise entsprechen die Abstände der positiv bzw. negativ geladenen Aminosäuren genau der Länge von Peptiden, die vom TAP-Komplex besonders effektiv erkannt werden. So liegen z.B. die essentiellen Reste Asparagin und Arginin an den Positionen 24 bzw. 32 acht Aminosäuren weit voneinander entfernt, was dem Längenoptimum TAP-gebundener Peptide entspricht (van Endert *et al.*, 1994). Zusammen bilden beide funktionalen Einheiten einschließlich ihrer Verbindungsschleife die aktive Domäne bezüglich

der Blockierung des TAP-Komplexes. Die Beobachtung, daß das zweite Element alleine nicht aktiv ist, unterstreicht die zweifache Bedeutung des Zusammenspiels beider Segmente und die Signifikanz der Membranassoziation. So wird der virale Inhibitor durch die Membran strukturell optimal für die Bindung an den TAP-Komplex vorbereitet und zusätzlich zu seinem Ziel geführt. Ähnliche Beobachtungen wurden u.a. für einige Peptidhormonrezeptoren gemacht (Schwyzer, 1995).

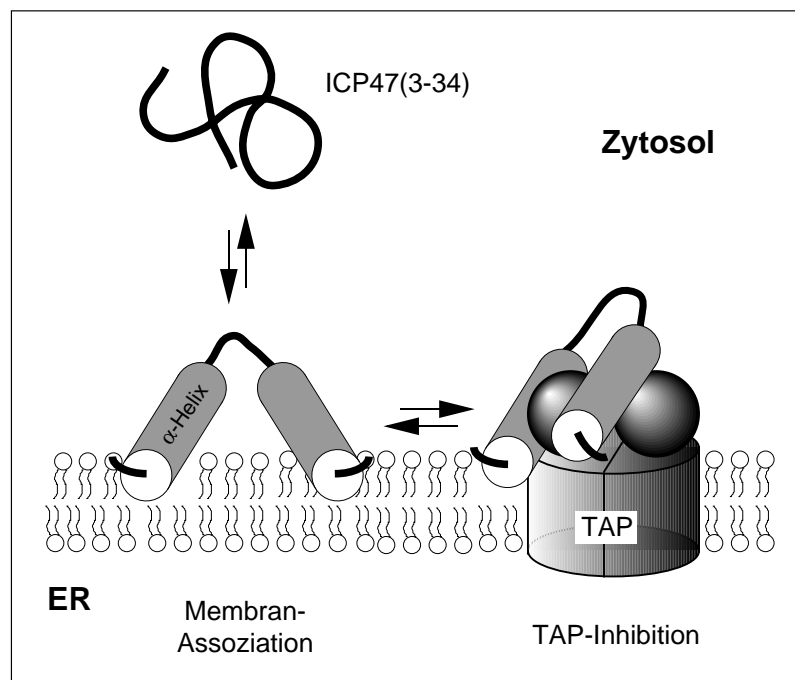


Abb. 36 Blockierung des TAP-Komplexes durch ICP47

ICP47 bindet an die ER-Membran. Dabei wird ein Konformationswechsel von einer Zufallsknäuel- zu einer α -helikale Struktur induziert und möglicherweise die strukturellen Voraussetzungen für die Interaktion mit dem TAP-Komplex geschaffen. Zusätzlich wird die Effizienz der TAP-Blockierung durch die Anreicherung des viralen Inhibitors an der ER-Membran erhöht.

Die Region zwischen den Positionen 35 und 88 entspricht der dritten Einheit innerhalb der ICP47-Sequenz. Dieses Segment spielt bei der Blockierung des TAP-Komplexes keine Rolle. Es ist bekannt, daß für Viren ein kleines Genom von Vorteil ist, um eine schnelle Replikation zu ermöglichen. Da nicht essentielle Proteinbereiche unter einem starken Selektionsdruck stehen, ist anzunehmen, daß das dritte Segment eine weitere bisher unbekannte Funktion von ICP47 vermittelt. Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch gestützt, daß die am stärksten konservierte Region (AS 35-52) innerhalb dieses Abschnitts liegt. Inwiefern es sich bei der zusätzlichen Aufgabe um eine eher passive Funktion handelt wie dem Schutz vor vorzeitigem proteolytischen Abbau oder ob ICP47 aktiv in weitere regulatorische oder enzymatische Prozesse eingreift, kann hier nicht beantwortet werden.

E. Zusammenfassung

Im ersten Teilprojekt der vorliegenden Dissertation wurde die Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes untersucht, die den initialen Schritt des Transportzyklusses darstellt. Dazu wurden Fluoreszein-markierte Peptide verwendet, deren Fluoreszenzsignal signifikant durch die Bindung an den TAP-Komplex gelöscht wird. Eine nicht-lineare Abhängigkeit der apparenten Assoziationsgeschwindigkeit von der Peptidkonzentration dokumentierte, daß sich die Bildung des Peptid-TAP-Komplexes aus einem schnellen Peptidbindungsschritt und einer langsamen Konformationsänderung zusammensetzt. Weitere kinetische und thermodynamische Studien ließen erkennen, daß dabei zumindest ein Viertel der TAP-Struktur umorganisiert wird. Dieser drastische Umbau des TAP-Moleküls deutete an, daß es sich bei der Peptid-induzierten Struktur um eine entscheidende Zwischenstufe im Transportzyklus handelt. Die Analyse der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten zeigte, daß die Umstrukturierung nicht für die hohe Substrataffinität erforderlich ist. Deswegen wird spekuliert, daß der Konformationswechsel die Peptidbeladung signalisiert und die strukturellen Voraussetzungen für die ATP-Hydrolyse schafft.

Im zweiten Teilprojekt wurden kritische Regionen und Wirkprinzipien des *Herpes Simplex Virus* (HSV)-kodierten TAP-Inhibitors ICP47 untersucht. Mit Hilfe von überlappenden kurzen ICP47-Fragmenten und systematischen N- und C-terminalen Verkürzungen wurde die Region ICP47(3-34) als aktive Domäne identifiziert. CD- und Fluoreszenzspektroskopie zeigten, daß ICP47 in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt, während die Assoziation an negativ geladene Membranen eine α -helikale Konformation induziert. Letztendlich wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zwei α -Helizes innerhalb der aktiven Domäne lokalisiert, die durch eine flexible Schleife miteinander verbunden sind. Mutationsstudien und chimäre ICP47-Varianten dokumentierten, daß neben einem Muster geladener Aminosäuren beide α -helikalen Bereiche für die Aktivität von ICP47 essentiell sind. Es wird angenommen, daß die Bindung von ICP47 an die negativ geladene ER-Membran aus zwei Gründen für die Blockierung des TAP-Komplexes entscheidend ist. Einerseits formt die Membran erst den eigentlichen Inhibitor, indem eine ICP47-Konformation stabilisiert wird, die die strukturellen Voraussetzung für die Wechselwirkung mit dem Antigenpeptid-Transporter besitzt. Andererseits wird der virale Inhibitor durch seine Akkumulation an der negativ geladenen ER-Membran zu seinem Zielprotein geführt.

F. Ausblick

1. Fluorogene Substrate des TAP-Komplexes

Die Eigenschaft des Antigenpeptid-Transporters fluorogene Substrate zu akzeptieren eröffnet zahlreiche Möglichkeiten. Radioaktive Methoden zur Untersuchung des TAP-Komplexes können durch Fluoreszenztechniken ersetzt werden. Basierend auf der beobachteten Fluoreszenzabnahme durch die Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes lassen sich homogene Hochdurchsatzverfahren entwickeln. Auf diese Weise können sowohl Wirkstoffbibliotheken nach spezifischen TAP-Inhibitoren durchsucht als auch Substratspezifitäten verschiedener TAP-Mutanten analysiert werden. Zusätzlich dient die TAP-abhängige Fluoreszenzlöschung als Aktivitätskontrolle bei Solubilisations-, Reinigungs- und Rekonstitutionsprozessen des TAP-Komplexes. Darüberhinaus kann die Architektur der Peptidbindungstasche untersucht werden, indem die Zugänglichkeit von externen Fluoreszenzlöschern mit verschiedener Ladung und Größe zu TAP-gebundenen Fluoreszein-Peptiden gemessen wird. Mit einer vergleichbaren Technik wurde bereits die Translokationspore des Sec61-Komplexes charakterisiert (Crowley *et al.*, 1993, Crowley *et al.*, 1994; Hamman *et al.*, 1997). Mit Hilfe von Energietransfer-Experimenten können Regionen des TAP-Komplexes identifiziert werden, die während der Peptid-TAP-Assoziation in die unmittelbare Nähe des gebundenen Fluoreszein-Peptids gelangen. Für diesen Zweck werden derzeit TAP-Mutanten erzeugt, die einen Cysteinrest an einer definierten Position tragen und somit eine regioselektive Markierung z.B. mit dem Fluorophor Rhodamin erlauben (Pawlitschko *et al.*, unveröffentlichte Daten). Schnelle, oberflächensensitive Methoden wie die totale innere Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) könnten den ersten Schritt der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes sichtbar machen. Dazu wird solubilisierter Antigenpeptid-Transporter oder TAP-haltige Mikrosomen auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert und die Fluoreszenzzunahme in der Grenzschicht nach Einspülen fluorogener TAP-Substrate detektiert. Auch der Energetisierungszyklus läßt sich mit Hilfe der fluorogenen Substrate untersuchen. Es liegen vorläufige Daten vor, daß ATP eine Konformationsänderung des TAP-Komplexes induziert, die zu einer eingeschränkten Zugänglichkeit von TAP-assoziierten Fluoreszein-Peptiden für Iodidionen führt (Neumann & Tampé, Daten nicht gezeigt). Zusätzlich sollte der eigentliche Transportschritt analysiert werden. Eine Möglichkeit wäre die Fluoreszenzzunahme beim Transport von Fluoreszein-Peptiden aus einem fluoreszenzlöschershaltigen Puffer in fluoreszenzlöschersfreie Vesikel zu messen. Bisher scheiterten diese Experimente an der mangelhaften Dichtigkeit von Mikrosomen für Fluoreszenzlöschers wie z.B. Iodidionen. Dieses Problem könnte allerdings durch die

Rekonsitution des TAP-Komplexes in künstlichen Liposomen gelöst werden. Eine besonders elegante Möglichkeit den Peptidtransport eines einzigen TAP-Komplexes zu untersuchen, bietet die *optical single transporter recording* (OSTR) Technik, die bereits erfolgreich beim Kernporenkomplex angewendet wurde (Tschodrich-Rotter & Peters, 1998; Keminer & Peters, 1999). Dazu werden die Poren eines Filterpapiers mit Fluoreszenz-markierten Peptiden gefüllt. Anschließend wird eine Seite des Filters mit Öl versiegelt, während auf die andere Filterseite TAP-haltige Mikrosomen adsorbiert werden. Über den TAP-Gehalt der Vesikel und den Porendurchmesser wird kontrolliert, wieviele TAP-Komplexe im Mittel über einer Filterpore liegen. Mit Hilfe eines inversen konfokalen Fluoreszenzscanning-Mikroskops kann der Transport der Fluoreszenz-markierten Peptiden aus der Filterporen in die Vesikel verfolgt werden.

2. Der virale TAP-Inhibitor ICP47

Die geringe Größe der aktiven Domäne von ICP47 macht sie zur optimalen Leitstruktur, um nicht-peptidische TAP-Inhibitoren zu entwickeln. Solche Verbindungen könnten als spezifische Immunsuppressoren z.B. in der Organtransplantation oder bei der Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden. Ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkungsprinzipien von ICP47 und TAP-Komplex sollte die Entwicklung von Wirkstoffen erleichtern, die die inhibitorische Wirkung des viralen Proteins aufheben und somit dem Immunsystem ermöglichen, HSV-Infektionen effektiv zu bekämpfen. Photoquervernetzungsstudien können z.B. zeigen, welche Segmente des ICP47-Moleküls an welche Regionen des TAP-Komplexes binden. ICP47-Bindungsstellen außerhalb der Peptidbindungstasche wären ideale Ziele für antivirale Medikamente. So können ICP47-Varianten, die an definierten Positionen radioaktiv markierte, photoaktivierbare Gruppen tragen mit dem TAP-Komplex quervernetzt werden. Durch anschließenden partiellen Verdau des Transporters können die markierten TAP-Fragmente mit Hilfe von regioselektiven Antikörpern oder Massenspektrometrie identifiziert werden. Auf ähnliche Weise wurde bereits die Peptidbindungsregion des TAP-Komplexes identifiziert (Nijenhuis *et al.*, 1996; Nijenhuis & Hämmerling, 1996). Zusätzlich kann die aktive Domäne von ICP47 in der Grundlagenforschung als nützliches Werkzeug dienen, um TAP-unabhängige Wege der Antigenpräsentation aufzudecken. Um die aktive Domäne in das Zytosol der zu untersuchenden Zellen zu schleußen, kann ein Konstrukt aus einem 16 Aminosäure langen Antennapedia-Fragment und ICP47(3-34) verwendet werden. Dieses Peptid aus Antennapedia, einem Transkriptionsfaktor aus *Drosophila*, ist dafür bekannt, die Internalisierung durch verschiedene Zelltypen zu vermitteln (Derossi *et al.*, 1998). Darüberhinaus würde auch eine kinetische und thermodynamische Analyse

der ICP47-TAP-Wechselwirkung neue Einsichten in die molekularen Vorgänge bei der Blockierung des TAP-Komplexes bringen. Trotz intensiver Bemühungen wurde allerdings bisher keine Fluoreszein-markierte ICP47-Variante gefunden, deren Fluoreszenz sich TAP-abhängig signifikant verändert. Alternativ kann mit Hilfe von Zugänglichkeitsuntersuchungen der TAP-gebundenen, Fluoreszein-markierten ICP47-Varianten für externe Fluoreszenzlöcher die Interaktion des viralen Inhibitors mit dem TAP-Komplex untersucht werden.

G. Literaturverzeichnis

- Abele, R. & Tampé, R. (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 405-419.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement VI, J.P., Boyd III, A.E., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nuguy, K., Bryan, J. & Nelson, D.A. (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulation of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.
- Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempé, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P.A., Früh, K. & Tampé, R. (1996a) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by Herpes simplex virus protein ICP47. *EMBO J.* 15, 3247-3255.
- Ahn, K.S., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P.A., Yang, Y. & Früh, K. (1996b) Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10990-10995.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J.H.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y. & Früh, K. (1997) The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 6, 613-621.
- Aleksandrov, A.A. & Riordan, R.J. (1998) Regulation of CFTR ion gating by MgATP. *FEBS Lett.* 431, 97-101.
- Ames, G.F.-L. & Lecar, H. (1992) ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: Analogy between channels and transporters. *FASEB J.* 6, 2660-2666.
- Andersson, M., Paabo, T., Nilsson, T. & Peterson, P.A. (1985) Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 43, 215-222.
- Anderson, C.M., Zucker, F.H. & Seitz, T.A. (1979) Space-Filling models of kinase clefts and conformational changes. *Science* 204, 375-380.
- Anderson, O.S. (1984) Gramicidin channels. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 531-548.
- Androlewicz, M.J., Anderson, K.S. & Cresswell, P. (1993) Evidences that transporters associated with antigen-processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9130-9134.
- Androlewicz, M.J. & Cresswell, P. (1994) Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1, 7-14.

- Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C.K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Fischer, L.K., Bavan, M.J. & Monaco, J.J. (1992) Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 355, 647-649.
- Ayala, Y.M., Vindigni, A., Nayal, M., Spolar, R.S., Record Jr., M.T. & Di Cera E. (1995) Thermodynamic investigation of hirudin binding to the slow and fast forms of thrombin: Evidence for folding transitions in the inhibitor and protease coupled to binding. *J. Mol. Biol.* 253, 787-798.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller E. (1998) The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Bennet, E.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. & Brodsky, F.M. (1999) Cutting edge: Adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J. Immunol.* 162, 5049-5052.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O.A., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. & Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* 365, 126-132.
- Blevitt, J.M., Früh, K., Glass C., Jackson, M.R., Peterson, P.A. & Huang S. (1999) A fluorescence-based high throughput screen for the transporter associated with antigen processing. *Journal of Biomolecular Screening* 4, 87-91.
- Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons D.S. & Davis, M.M. (1999) Thermodynamics of T cell receptor binding to peptide-MHC: Evidence for a general mechanism of molecular scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11446-11451.
- Bouvier, M. & Wiley, D.C. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265, 398-402.
- Brown, M.G., Driscoll, J. & Monaco, J.J. (1991) Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome multicatalytic proteinase complexes. *Nature* 353, 355-357.
- Burgert, H.-G. & Kvist, S. (1985) An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 41, 987-997.
- Cantley, L.C., Carilli, C.T., Smith, R.L. & Perman, D. (1983) Conformational changes of Na,K-ATPase necessary for transport. *Curr. Top. Membr. Transp.* 19, 315-322.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Chen, H.L., Gabrilovic, D., Tampé, R., Girgis, K.R., Nadaf, S. & Carbone, D.P. (1996) A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics* 13, 210-213.
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J. & Welsh, M.J. (1991) Phosphorylation of the R-domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chlorid channel. *Cell* 66, 1027-1036.

- Collins, F.S. (1992) Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774-779.
- Cotten, J.F., Ostegaard, L.S., Carson, M.R. & Welsh M.J. (1996) Effect of cystic fibrosis associated mutations in the 4th intracellular loop of cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 271, 21279-21284.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Diedrich, G. (1999) The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172, 21-28, 1999
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D. & Johnson, A.E. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115.
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D. & Johnson, A.E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461-471.
- Dassa, E. & Hofnung, M. (1985) Sequence of gene malG in E. coli K12: Homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* 4, 2287-2293.
- Dassa E. (1990) Cellular localization of the MalG protein from maltose transport system in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genetics* 222, 33-36.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. & de Vries, J. (1991) IL-10 inhibits cytokin synthesis by human monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220.
- Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz A. (1998) Trojan peptides: The penetratin system for intracellular delivery. *Trends in Cell Biology* 8, 84-87.
- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, Geoffrey W. & Howard, J.C. (1990) MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348, 738-741.
- Doige, C.A. & Ames, G.F.L. (1993) ATP-dependent transport-systems in bacteria and humans - relevance to cystic-fibrosis and multidrug-resistance. *Annu. Rev. of Microbiol.* 47, 291-319.
- Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Tampé, R. (1996) Effects of MHC-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes - Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 235, 404-415.
- Elliot, T. (1997) How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol. Today* 18, 375-379.
- Endicott, J.A. & Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein - mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137-171.
- Engelhard, V.H. (1994) Die Antigen-Prozessierung. *Spektrum der Wissenschaft* 10, 48-56.

- Egner, U., Tomasselli, A.G. & Schulz, G.E. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 195, 649-658.
- Falk, K., Rötzschke, O. & Rammensee, H.-G. (1990) Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348, 248-251.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H.-G. (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Fahnenstock, M.L., Johnson, J.L., Feldman, R.M., Neveu, J.M., Lane, W.S. & Bjorkman, P.J. (1995) The class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity* 3, 583-590.
- Finkelstein, A.V. & Janin, J. (1989) The price of lost freedom entropy of bimolecular complex formation. *Protein Engineering* 3, 1-4.
- Felmlee, T., Pellett, S. & Welch, R.A. (1985) Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal haemolysin. *J. Bacteriol.* 163, 94-105.
- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. & Wilson, I.A. (1992) Cristal structure of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science* 257, 919-927.
- Froshauer, J. & Beckwith, J. (1984) The nucleotide sequence of the gene for malF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of E. coli. *J. Biol. Chem.* 259, 10896-10903.
- Froshauer, J., Green, G.N., Boyd, D., McGovern, K. & Beckwith, J. (1988) Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 200, 501-511.
- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempé, P., Tampé, R., Peterson, P.A. & Yang, Y. (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375, 415-418.
- Galocha, B., Hill, A., Barnett, B.C., Dolan, A., Raimondi, A., Cook, R.F., Brunner, J., McGeoch, D.J. & Ploegh, H.L. (1997) The active site of ICP47, a Herpes Simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH₂-terminal 35 residues. *J. Exp. Med.* 185, 1565-1572.
- Gileadi, U. & Higgins, C.F. (1997) Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter associated with antigen presentation (TAP1) expressed in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 272, 11103-11108.
- Gilson, E., Nikaido, H. & Hofnung, M. (1982) Sequence of the malK gene in E. coli K12. *Nucleic Acids Res.* 10, 7449-7458.
- Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, L.A., Kerr, J. & Townsdale (1991) A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353, 355-357.

- Gottesmann, M.M. & Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62 385-427.
- Greenberger, L.M. (1993) Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domain 6 and domain 12. *J. Biol. Chem.* 268, 11417-11425.
- Griko, Y.V., Rogov, V., Privalov, P.L. (1992) Domains in lambda cro repressor. A calorimetric study. *Biochemistry* 31, 12701-12705.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, M., Bochtler, H., Bartunik, D. & Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Grommé, M., van der Valk, R., Sliedregt, K., Vernie, L., Liskamp, R., Hämmerling, G.J., Koopmann, J.-O., Momburg, F. & Neefjes, J.J. (1997) The rational design of TAP inhibitors using peptide substrate modifications and peptidomimetics. *Eur. J. Immun.* 27, 898-904.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E. & Johnson, A.E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89, 535-44.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015-1069.
- Hegerl, R., Pfeifer, G., Pühler, G., Dahlmann, B. & Baumeister, W. (1991) The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett.* 283, 117-121.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H. & Momburg, F. (1997) A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 6, 623-632.
- Higgins, C.F. (1992) ABC Transporters: From Microorganism to Man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8, 67-113.
- Hill, A.B., Barnett, B.C., McMichael, A.J. & McGeoch, D.J. (1994) HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with Herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Immunol.* 152, 2736-2741.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H., & Johnson, D. (1995) Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375, 411-15.
- Hiromi, K. (1979) Kinetic of fast enzyme reactions, John Wiley & Sons, Halsted Press, New York
- Holland, I.B. & Blight, M.A. (1999) ABC-ATPase, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293, 381-399.

- Holler, E., Rupley, J.A. & Hess, G.P. (1969) Kinetics of lysozyme-substrate interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 423-429.
- Hoof, T., Demmer, A., Hadam, M.R., Riordan, J.R. & Tümmler, B. (1994) Cystic fibrosis-type mutational analysis in the ATP-binding cassette transporter signature of human p-glycoprotein *mdr1*. *J. Biol. Chem.* 269, 20575-20583.
- Hughes, E.A. & Cresswell, P. (1998) The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.* 8, 709-712.
- Hung, L.-W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, G.F.-L. & Kim, S.-H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396, 703-707.
- Janin, J. & Chothia, C. (1978) Role of hydrophobicity in the binding of coenzymes. Appendix: Translational and rotational contribution to the free energy of dissociation. *Biochemistry* 17, 2943-2948.
- Jennings, S.R., Rice, P.L., Kloszewski, E.D., Anderson, R.W., Thompson, D.L. & Tevethia, S.S. (1985) Effect of Herpes simplex virus type 1 and 2 on surface expression of class I major histocompatibility antigens on infected cells. *J. Virol.* 56, 757-766.
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the MDR (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 4534-4540.
- Kelly, A.P., Powis, S.H., Kerr, L.-A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. & Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355, 641-644.
- Keminer, O. & Peters, R. (1999) Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* 77, 217-228.
- Kim, J.S. & Raines, R.T. (1993) Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins. *Protein Science* 2, 348-356.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N. & Goldberg, A.L. (1998) Range size of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273, 1982-1989.
- Klein, J., Satta, Y., Ohuigin, C & Takahata, N. (1993) The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 269-295.
- Knight, S.C. & Stagg, A.J. (1993) Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 374-382.
- Knittler, M.R., Alberts, P., Deverson, E.V. & Howard, J.C. (1999) Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr. Biol.* 9, 999-1008.

- Koopmann J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J. & Momburg, F. (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen-processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* 26, 1720-1728.
- Krasne, S., Eisenman, G. & Szabo, G. (1971) Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonacin, valinomycin, and gramicidin. *Science* 174, 412-415.
- Kupfer, A. & Singer, S.J. (1989) Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: Immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 309-337.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369, 621-628.
- Lammert, E., Arnold, D., Nijenhuis, M., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Brunner, J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. & Schild, H. (1997) The endoplasmic-reticulum resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur. J. Immunol.* 27, 923-927.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lehner, P.J. & Trowsdale, J. (1998a) Antigen presentation: Coming out gracefully. *Curr. Biol.* 8, 605-608.
- Lehner, P.J., Surman, M.J. & Cresswell, P. (1998b) Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8, 221-231.
- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M. & Hämmerling G.J. (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.* 17, 2186-2195.
- Liu, P.-Q., Liu, C.E. & Ames F.-L. (1999) Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease. *J. Biol. Chem.* 274, 18310-18318.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M. & Sussman, J.L. (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5076-5080.
- Ljunggren, H.-G., Stam, N.S., Ohlen, C., Neefjes, J.J., Hogland, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N.M., Townsend, A., Karre, K. & Ploegh, H.L. (1990) Empty class I molecules come out in the cold. *Nature* 346, 476-480.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1993a) Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 3143-3149.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1993b) Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 19965-19972.

- Löwe, J., Stock, D., Lap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archeon *Thermoplasma acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Madden, D.R. (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 587-622.
- Madden, D.R., Garboczi, D.N. & Wiley, D.C. (1993) The antigenic identity of peptide-MHC complexes: A comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75, 693-708.
- Manavalan, P., Dearborn, D.G., McPherson, J.M. & Smith, A.E. (1995) Sequence homologies between nucleotide binding regions of CFTR and G-proteins suggest structural and functional similarities. *FEBS Lett.* 366, 87-91.
- Marusina, K., Reid, G., Gabathuler, R., Jefferies, W. & Monaco, J.J. (1997) Novel peptide-binding proteins and peptide-transport in normal and TAP-deficient microsomes. *Biochemistry* 36, 856-863.
- McConahey, P.J. & Dixon, F.J. (1980) Radioiodination of proteins by use of the chloramine-T method. *Meth. Enzymol.* 70, 429-431.
- McGeoch, D.J. Dolan, A., Donald, S. & Rixon, F.J. (1985) Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Mol. Biol.* 181, 1-13.
- McGeoch, D.J. Dalrymple, M.A. Davison, A.J. Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E. & Taylor, P. (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69, 1531-1574.
- Meijer, I., Boot, A.J.M., Mahabir, G., Zantemam, A. & van der Eb, A.J. (1992) Reduced binding activity of transcription factor NF-κB accounts for MHC class I repression in adenovirus type 12 E1-transformed cells. *Cell. Immunol.* 145, 56-65.
- Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. & Tampé, R. (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett.* 351, 443-447.
- Meyer, T.H. (1996) Funktionale Expression und Charakterisierung des Antigenpeptid-Transporters (TAP). Technische Universität München, Doktorarbeit
- Momburg, F., Armandola, E.A., Post, M. & Hämmerling, G.J. (1996) Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate-specificity. *J. Immunol.* 156, 1756-1763.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hämmerling, G.J. & Neefjes, J.J. (1994) Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-651.

- Momburg, F. & Hämmerling G.J. (1998) Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class-I molecules. *Adv. Immunol.* 68, 191-256.
- Monaco, J.J., Cho, S. & Attaya, M. (1990) Transporter protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science* 250, 1723-1726.
- Moore, K.W., O Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. & Mosmann, T.R. (1993) Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-190.
- Morrice, N.A. & Powis, S.J. (1998) A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr. Biol.* 8, 713-716.
- Morris, D.I., Greenberger, L.M., Bruggemann, E.P., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Seamon, K.B. (1994) Localization of the forskolin labeling sites to both halves of P-glycoprotein: Similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin. *Mol. Pharmacology* 46, 329-337.
- Müller, K.M., Ebensperger, C. & Tampé, R. (1994) Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.* 269, 14032-14037.
- Murphy, K.P., Privalov, P.L. & Gill, S.L. (1990) Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science* 247, 559-561.
- Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hämmerling, G.J. (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-771.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focussing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J. & Hämmerling, G.J. (1996a) Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.* 157, 2186-2195.
- Nijenhuis, M. & Hämmerling, G.J. (1996b) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding-site. *J. Immunol.* 157, 5467-5477.
- Nohno, T., Saito, T. & Hong, J.S. (1986) Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (glnHPQ). *Mol. Gen. Genet.* 205, 260-269.
- Ohkuma, S. & Poole, B. (1978) Fluorescence probe measurements of the intralysosomal pH in living cells and perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3327-3331.
- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M. & Hämmerling, G.J. (1991) Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.

- Ortmann, B., Androlewicz, M.J. & Cresswell, P. (1994) MHC class I/β2 microglobulin complexes associated with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368, 864-867.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampé, R., Spies, T. & Trowsdale, J. (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-1309.
- Powis, S.J., Townsend, A.R.M., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, Geoffrey W. & Howard, J.C. (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 354, 528-531.
- Privalov, P.L. & Makhatadze, G.I. (1992) Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J. Mol. Biol.* 224, 715-723.
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Muller, S., Engel, A., Hegerl, R. & Baumeister W. (1992) Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J.* 11, 1607-1616.
- Rammensee, H.-G., Friede, T. & Stevanovic, S. (1995) MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.
- Reidl, J., Ehrmann, M. & Boos, W. (1989) MalK, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli* is highly homologous to the receptor proteins GalR, CytR and lacI. *J. Bacteriol.* 170, 4888-4899.
- Rock, K.L. & Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Roelse, J., Grommé, M., Momburg, F., Hämmerling, G. & Neefjes, J. (1994) Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* 180, 1591-1597.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J. & Baumberg, S. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4, 1207-1214.
- Russ, G., Esquivel, F., Yewdell, J.W., Cresswell, P., Spies, T & Bennick, J.R. (1995) Assembly, intracellular localization, and nucleotide binding properties of the human peptide transporters TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Biol. Chem.* 270, 21312-21318.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette., J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P. & Assmann, G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics* 22, 352-355.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, P. & Cresswell P. (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class-I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) A laboratory manual (Second Edition). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schumacher, T.N., de Bruijn, M.L., Vernie, L.N., Kast, W.M., Melief, C.J. & Neefjes, J.J. (1991) Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature* 350, 703-706.
- Schumacher, T.N., Kantesaria, D.V., Heemels, M.T., Ashton-Rickardt, P.G., Shepherd, J.C., Früh, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S. & Ploegh, H.L. (1994) Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* 179, 533-540.
- Schwyzler, R. (1995) 100 years lock-and-key concept: Are peptide key shaped and guided to their receptors by the target cell membrane? *Biopolymers* 37, 5-16.
- Senior, A.F. & Al-Shawi, M.K. (1992) Further examination of seventeen mutations in *Escherichia coli* F1-ATPase beta-subunit. *J. Biol. Chem.* 267, 21471-21478.
- Senior, A.E., Wilke-Mounts, S. & Al-Shawi, M.K. (1993) Lysine 155 in beta-subunit is a catalytic residue of *Escherichia coli* F1 ATPase. *J. Biol. Chem.* 268, 6989-6994.
- Senior, A.E. & Gadsby, D.C. (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin. Cancer Biol.* 8, 143-150.
- Seufert, W. & Jentsch, S. (1992) In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J.* 11, 3077-3080.
- Sheps, J.A., Cheung, I. & Ling, V. (1995) Hemolysin transport in *Escherichia coli*: Point mutations in the HlyB compensates for a deletion in the predicted amphiphilic helix region of the HlyA signal. *J. Biol. Chem.* 270, 14829-14834.
- Sherperd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A.J. & Tonegawa, S. (1993) TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74, 577-584.
- Spee, P. & Neefjes, J. (1997) TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur. J. Immunol.* 27, 2441-2449.
- Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D. & DeMars, R. (1990) A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348, 744-747.
- Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. & DeMars, R. (1992) Presentation of viral antigen by MHC class molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 355, 644-646.
- Spolar, R.S., Ha, J.H. & Record Jr. M.T. (1989) Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8382-8385.
- Spolar, R.S., Livingstone, J.R. & Record Jr. M.T. (1992) Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surfaces from water. *Biochemistry* 31, 3947-3955.

- Spolar, R.S. & Record Jr., M.T. (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* 263, 777-784.
- Stoeckenius, W. (1976) The purple membrane of salt-loving bacteria. *Sci. Amer.* 234, 38-46.
- Sturtevant, J.M. (1977) Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2236-2240.
- Suh, W.K., Cohen-Doyle, M.F., Früh, K., Peterson, P.A. & Williams, D.B. (1994) Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 264, 1322-1326.
- Suh, W.K., Mitchell, E.K., Yang, Y., Peterson, P.A., Waneck, G.L. & Williams, D.B. (1996) MHC-class I molecules form ternary complexes with calnexin and TAP and undergo peptide-regulated interaction with TAP via extracellular domains. *J. Exp. Med.* 184, 337-348.
- Sun, H. & Nathans, J. (2000) ABCR: Rod photoreceptors-specific ABC transporter responsible for Stargardt disease. *Meth. Enzymol.* 315, 879-897.
- Tairi, A.-P., Hovius, R., Pick, H., Blasey, H., Bernard, A., Surprenant, A., Lundström, K. & Vogel H. (1998) Ligand binding to the 5HT₃ receptor studied with a novel fluorescent ligand. *Biochemistry* 37, 15850-15864.
- Takahasi, K., Casey, J.L. & Sturtevant, J.M. (1981) Thermodynamics of the binding of D-glucose to yeast hexokinase. *Biochemistry* 20, 4693-4697.
- Tame, J.R.H., Sleight, S.H., Wilkinson, A.J. & Ladbury, J.E. (1996) The role of water in sequence-independent ligand binding by an oligopeptide transport protein. *Nature Structure Biology* 3, 998-1001.
- Tampé, R., Urlinger, S., Pawlitschko, K. & Uebel, S. (1997) The transporter associated with antigen processing (TAP). In K. Kuchler, A. Rubartelli, B. Holland (Eds.): *Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man*. Springer, New York, 115-136.
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohllk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F. & Bryan, J. (1995) Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426-429.
- Tomazin, R., Hill, B.A., Jugovic, P., York, I., Endert, P., Ploegh, H.L., Andrews, D.W. & D.C. Johnson (1996) Stable binding of herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J.* 15, 3256-3266.
- Toomela, T., Jolkkonen, M., Rinken, A., Jarv, J. & Karlsson, E. (1994) Two-Step binding of green mamba toxin to muscarinic acetylcholin receptor. *FEBS Lett.* 352, 95-97.
- Townsend, A. & von Bodmer, H. (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 601-624.
- Townsend, A., Elliot, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. & Tse, A. (1990) Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62, 285-295.

- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. & Kelly, A. (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348, 741-744.
- Tschodrich-Rotter, M. & Peters, R. (1998) An optical method for recording the activity of single transporters in membrane patches. *J. of Microscopy* 192, 114-125.
- Uebel, S., Meyer, T.H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmüller, K.H. & Tampé, R. (1995) Requirements for peptide binding to human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 270, 18512-18516.
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller K.-H., Jung, G. & Tampé, R. (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8976-8981.
- Uebel, S. & Tampé, R. (1999) Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 203-208.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T.H., Uebel, S. & Tampé, R. (1997) Intracellular location, complex-formation, and function of the transporter associated with antigen-processing in yeast. *Eur. J. Biochem.* 245, 266-272.
- van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F. & McDevitt, H.O. (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1, 491-500.
- van Endert, P.M. (1999) Role of nucleotides and peptide substrate for stability and functional state of the human ABC family transporters associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.* 274, 14632-14638.
- Varadarajan, R., Connelly, P.R., Sturtevant, J.M. & Richards, M. (1992) Heat capacity changes for protein peptide interactions in the ribonuclease S system. *Biochemistry*, 31, 1421-1426.
- Vassilakos, A., Cohendoyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R. & Williams, D.B. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class-I histocompatibility molecules. *EMBO J.* 15, 1495-1506.
- Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M., N., Johnson, K., E., Kastelein, R., Fiorentino, D., F., de Vries, J., E., Roncarolo, M., G., Mosmann, T., R., & Moore, K., W. (1991) Isolation and expression of human cytokines synthesis inhibitor factor (CSIF/IL) cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1172-1176.
- Vitetta, E.S., Fernandez-Botran, R., Myers, C.D. & Sanders, V.M. (1989) Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.* 45, 1-105.
- von Boehmer, H. (1994) Positive Selection of Lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.
- Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F. & Neefjes, J.J. (1999) Membrane topology of the two subunits of the transporter associated with antigen processing revealed a three domain structure. *J. Immunol.* 163, 6679-6685.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gray, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.
- Wang, R.C., Seror, S.J., Blight, M., Pratt, J.M., Broome-Smith, J.K. & Holland, I.B. (1991) Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.* 217, 441-454.
- Watts, T.H., Brian, A.A., Kappler, J.W., Marrack, P. & McConnell, H.M. (1984) Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-Ad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7564-7571.
- Weinstein, S., Wallace, B.A., Blout, E.R., Morrow, J.S. & Veatch, W. (1979) Conformation of gramicidin A channel in phospholipid vesicles: A ¹³C and ¹⁹F nuclear magnetic resonance study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4230-4234.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister W. (1994) Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* 349, 205-209.
- Whitton J.L. & Clements, J.B. (1984) The junctions between the repetitive and the short unique sequences of the herpes simplex virus genome are determined by the polypeptide-coding regions of two spliced immediate-early mRNAs. *J. Gen. Virol.* 65, 451-466.
- Wieprecht, T., Beyermann, M. & Seelig, J. (1999) Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: Thermodynamics and structure. *Biochemistry* 38, 10377-10387.
- Williams, D.B. & Watts, T.H. (1995) Molecular chaperons in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 77-84.
- Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., & Ploegh, H.L. (1996a) The human cytomegalovirus US11 gene-product dislocates MHC class-I heavy-chains from the endoplasmic-reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.
- Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. & Ploegh, H.L. (1996b) Sec61-mediated transfer of a membrane-protein from the endoplasmic-reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Wright, J.K., Seckler, R. & Overath, P. (1986) Molecular aspects of sugar:ion cotransport. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 225-248.
- Yamada, K. (1999) Thermodynamic analyses of calcium binding to troponin C, calmodulin and parvalbumin by using microcalorimetry. *Mol. Cell. Biochem.* 190, 39-45.
- Yin, Y., Zhang, F., Ling, V. & Arrowsmith, C. (1995) Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysinA and leukotoxin. *FEBS Lett.* 366, 1-5.

- Yorek, M.A. (1993) Phospholipids handbook (Cevc, G., Ed.) Marcel Dekker Inc., New York.
- York, I.A., Roop, C., Andrews, D.W., Riddell, S.R., Graham, F.L., & Johnson, D.C. (1994) A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* 77, 525-535.
- York, I.A. & Rock, K.L. (1996) Antigen-processing and presentation by the class-I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. of Immunol.* 14, 369-396.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampé, R., Lazis, S. & Hammerschmidt, W. (1997) Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and epstein-barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390-2397.
- Zhang, F., Yin, Y., Arrowsmith, C.H. & Ling, V. (1995) Secretion and circular dichroism analysis of the C-terminal signal peptides of HlyA and LktA. *Biochemistry* 34, 4193-4201.
- Zhang, W., Young, A.C., Imarai, M., Nathenson, S.G. & Sacchettini, J.C. (1992) Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8403-8407.

H. Abkürzungen

Φ	Cysteinacetamidofluoreszein
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Bindungskassette
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	Adrenoleukodystrophieprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CD	Zirkulardichroismus
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CMC	kritische Mizellare Konzentration
cpm	Impulse pro Minute
cps	Impulse pro Sekunde
DHDAB	Dihexadezyldimethylammoniumbromid
DLPA	Dilauryl-L-α-phosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoyl-L-α-phosphatidylcholin
DMPG	Dimyristoyl-L-α-phosphatidylglyzin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ex	Anregung
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GCG	<i>Genetics Computer Group</i>
geb	gebunden
ges	gesamt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR-flu	[1.2.3.9-Tetrahydro-3-[(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)methyl]-9-(3-amino-(N-fluorescein-thiocarbonyl)-propyl)-4H-carbazol-4-one]
GST	Glutathion S-Transferase
HCMV	humanpathogenen Zytomegalievirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
h	Stunde
hIL-10	humanes Interleukin-10
HisP	Histidinpermease P
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>

HSV1	<i>Herpes Simplex Virus Typ1</i>
HSV2	<i>Herpes Simplex Virus Typ2</i>
IC ₅₀	Inhibitionskonzentration (50 %)
ICP47	<i>infected cell protein 47</i>
ICP47-1	ICP47-Variante des HSV1
ICP47-2	ICP47-Variante des HSV2
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Plasmamembran
MDR	Multidrogen-Resistenz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTAP	muriner TAP-Komplex
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMR	Kernspinresonanz
NOE	nuklearer Overhauser Effekt
NOESY	zwei-dimensionaler nuklearer Overhausereffekt
OAc	Acetat
OM	äußere Plasmamembran
Opp	Oligopeptidpermease
OSTR	<i>optical single transporter recording</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PHHI	<i>persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	Palmitoyloley1-L- α -phosphaditylcholin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodezylsulfat
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N, N, N', N' tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIRFM	totale innere Reflektions- Fluoreszenzmikroskopie
TM	Transmembranhelix
u. a.	unter anderem
ungeb	ungebunden
UV	ultra violet
v	Volumen
vIL-10	virales Interleukin-10

Vis	sichtbar
w	Gewicht

Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen der IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Biochemistry* - *International Union of Biochemistry*) abgekürzt.